

**Bütilhidroksitoluen'in Sıçan Dokularında Laktat  
Dehidrogenaz ve Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz  
Aktiviteleri Üzerine Etkisi**

**Aboush EL ARFAOUI**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÜTİLHİDROKSİTOLUEN'İN SIÇAN DOKULARINDA LAKTAT  
DEHİDROGENAZ VE GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ  
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Aboush EL ARFAOUI

0000-0002 0057 3832

Doç. Dr. Egemen DERE  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ ONAYI

Aboush EL ARFAOUI tarafından hazırlanan “Bütihidroksitoluen’in Sıçan Dokularında Laktat Dehidrogenaz ve Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Aktiviteleri Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Doç. Dr. Egemen DERE

**Başkan :** Doç. Dr. Egemen DERE  
0000-0001-9572-1051  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye :** Prof. Dr. Ferda ARI  
0000-0002-6729-7908  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye :** Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER  
0000-0002-0290-1166  
Bursa Teknik Üniversitesi,  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,  
Biyomühendislik Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN**

**Enstitü Müdürü**

.../.../....

**B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**29/08/2022**

**Aboush EL ARFAOUI**

**TEZ YAYINLANMA**  
**FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI**

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Doç. Dr. Egemen DERE  
29/08/2022

Aboush EL ARFAOUI  
29/08/2022

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum  
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum  
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **BÜTİLHİDROKSİTOLUEN'İN SIÇAN DOKULARINDA LAKTAT DEHİDROGENAZ VE GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Aboush EL ARFAOUI**

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Egemen DERE

Bütillenmiş hidrokstoluen (BHT), öncelikle antioksidan özellikleri ile gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca, kozmetik, ilaç, kauçuk, elektrik transformatör yağı ve mumyalama sıvısı gibi çeşitli ürünlerde bir antioksidan katkı maddesi olarak belgelenmiştir. LDH, tüm hücrelerde bulunan stabil bir sitoplazmik enzimdir. LDH, plazma membranı hasar gördüğünde hücre kültürü süpernatantına hızla salınır. Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enzimi, pentoz fosfat metabolik yolunun en önemli enzimlerinden birisidir. Bu çalışmada, BHT maruziyetinin, sıçanların karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer dokularında LDH ve G6PDH aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. LDH ve G6PDH aktivitesi izlenmiş, BHT'nin neden olduğu sitotoksikite değerlendirilmiş ve çalışılan dokulardaki hasar yorumlanmıştır, çalışmada 200-250gr ağırlığında wistar-albino sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar kontrol ve deney gruplarına ayrılarak, her çalışma saatinde deney grubu ve kontrol grubu için 3'er sıçan ele alınmıştır. BHT'nin 125, 250 ve 500 mg/kg dozları intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Enjeksiyondan 12 ve 24 saat sonra servikal dislokasyon ile öldürülerek sıçanların karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer dokuları süratle çıkarılmıştır. LDH ve G6PDH aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Sonuç olarak beyinde LDH aktiviteleri, BHT uygulamasından sonra kontrol gruplara göre anlamlı bir artış, ancak karaciğer ve böbrekte anlamlı bir azalış göstermiştir. G6PDH aktivitesinin kontrol değerlerine göre düşüş ve çıkışlar göstermesine rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamsız görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Bütihidroksitoluen, Laktat dehidrojenaz, Glikoz 6 fosfat dehidrojenaz, Karaciğer, Akciğer, Beyin, Böbrek.

**2022, vii + 44 sayfa.**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **EFFECT OF BUTYLHYDROXYTOLUENE ON LACTATE DEHYDROGENASE AND GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITIES IN RAT TISSUES**

**Aboush EL ARFAOUI**

Bursa Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

**Supervisor:** Assoc. Dr. Egemen DERE

Butylated hydroxytoluene (BHT) is primarily used as a food additive for its antioxidant properties. This product has also been documented as an antioxidant additive in a variety of products such as cosmetics, pharmaceuticals, rubber, electrical transformer oil, and embalming fluid. LDH is a stable cytoplasmic enzyme found in all cells. LDH is rapidly released into the cell culture supernatant when the plasma membrane is damaged. The glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzyme is one of the most important enzymes of the pentose phosphate metabolic pathway. In this study, the effect of BHT exposure on LDH and G6PDH activities in liver, kidney, brain and lung tissues of rats was investigated. LDH and G6PDH activity were monitored, cytotoxicity caused by BHT was evaluated and damage in the studied tissues was interpreted. Wistar-Albino rats weighing 200-250gr were used in the study. The animals were divided into control and experimental groups, and 3 rats were handled each time for the experimental group and the control group. 125, 250 and 500 mg/kg doses of BHT were administered intraperitoneally. 12 hours and 24 hours following injection, the rats were killed by cervical dislocation and liver, kidney, brain and lung tissues were removed quickly. The activities of LDH and G6PDH were determined. Our result showed that BHT administration increases LDH activities significantly in the brain compared to the control groups. However, a significant decrease in LDH activities was observed in the liver and kidney. Although G6PDH activity showed decreases and increases compared to control values, these differences are statistically insignificant.

**Key words:** Butylated hydroxytoluene, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, liver, kidney, brain, lung tissue.

**2022, vii + 44 pages.**

## **TEŞEKKÜR**

Öncelikle; danışman hocam Sayın Doç. Dr. Egemen DERE'ye olağanüstü süpervizyonunun kalitesi, sabrı, ulaşılabilirliği, tavsiyeleri, araştırma çalışmasına verdiği katkılar ve deneyimlerini bana aktardığı için kendisine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Teşviki ve sorularıma cevap verme sabrını gösterdiği için Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya, Tezimin olgunlaşması ve başlamasında bana verdiği destek için Sayın Doç. Dr. Fikriye POLAT'a, bu süreçte bana manevi ve fikri desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Raissa SOAMANJARY ve Ahmet BARAT'a tezimde bana yardımcı olan laboratuvardaki bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaşamımın her adımında desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi ve minnetimi sunarım.

Saygılarımla ve şükranlarımla...



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1 GİRİŞ.....	1
2 KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Bütillenmiş hidrositoluen (BHT).....	3
2.1.1 BHT'nin özellikleri ve kimyasal yapısı.....	3
2.1.2 BHT'nin sentezi ve kullanımı.....	5
2.1.3 Yönetmelikler.....	6
2.1.4 BHT'nin antioksidan özellikleri.....	7
2.1.5 Emilim ve metabolizma.....	9
2.1.6 Toksik etkileri.....	14
2.2 Laktat dehidrogenaz (LDH) EC 1.1.1.27.....	16
2.3 Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH).....	19
3 MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1 Materyal.....	21
3.1.1 Kimyasal maddeler ve kitler.....	21
3.1.2 Sarf malzemeler.....	21
3.1.3 Cihazlar.....	21
3.2 Yöntem.....	22
3.2.1 Deney Hayvanları.....	22
3.2.2 BHT'ye Maruziyetinin Gerçekleştirilmesi.....	22
3.2.3 Doku Örneklerinin Toplanması.....	22
3.2.4 LDH Aktivite Ölçümü.....	23
3.2.5 G6PDH Aktivite Ölçümü.....	25
3.2.6 İstatistiksel analiz.....	26
4 BULGULAR.....	27
4.1 LDH Bulguları.....	27
4.1.1 Karaciğerde LDH aktivitesi.....	27
4.1.2 Akciğerde LDH aktivitesi.....	27
4.1.3 Beyin LDH aktivitesi.....	28
4.1.4 Böbrek LDH aktivitesi.....	28
4.2 G6PDH Bulguları.....	30
4.2.1 Karaciğer G6PDH aktivitesi.....	30
4.2.2 Akciğer G6PDH aktivitesi.....	30
4.2.3 Beyin G6PDH aktivitesi.....	30
4.2.4 Böbrek G6PDH aktivitesi.....	31
5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
BALF	Bronkoalveolar lavaj sıvısı
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Butillenmiş Hidroksitoluen
BHT-CHO	3,5-Di-tert-butil-4-hidroksibenzaldehit
BHT-CH <sub>2</sub> OH	3,5-Di-tert-butil-4-hidroksi-benzil alkol
BHT-COOH	3,5-Di-tert-butil-4-hidroksibenzoik asit
BHT-OH	2,6-Di-tert-butil-4-hidroksi-4-metil-2,5 sikloheksadien-1-on
BHT-Q	2,6-Di-tert-butil-2,5-sikloheksadien-1,4-dion
BHT-QM	2,6-Di-tert-butil-4-metilen-2,5-sikloheksadien-1-on
CAS	Kimyasal Özetler Servisi
DBP	2,6-Di-tert-butil-4-fenol
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EINECS	Avrupa Mevcut Ticari Kimyasal Maddeler Envanteri
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilir
G6P	Glikoz-6-Posfat
G6PDH	Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Ortak FAO-WHO Uzman Komitesi
LDH	Laktat Dehidrojenaz
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NOAEL	Gözlenebilir Olumsuz Etki Göstermeyen Doz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCF	Tüketici Finansmanı Anketi
SFA	Sentetik Fenolik Antioksidanlar
TBHQ	Tert-Bütihidrokinon

## SEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Bütillenmiş hidroksitoluenin yapısı (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O).....	3
Şekil 2.2. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT).....	6
Şekil 2.3. BHT'nin reaktif oksijen türevleri ile etkileşimleri.....	8
Şekil 2.4. BHT'nin antioksidan ve prooksidan aktivitesi için önerilen tepkime yolları...	12
Şekil 2.5. Laktat dehidrojenaz'ın yapısı.....	16
Şekil 2.6. Laktat dehidrojenaz tarafından katalize edilen geri dönüşümlü tepkime.....	16
Şekil 2.7. LDH izoenzimlerinin bileşimi.....	17
Şekil 2.8. Enzim katalizli tepkimele için farklı LDH izomerlerinin afinitesi.....	18
Şekil 2.9. G6PDH'ın tepkimesi.....	20
Şekil 4.1. Karaciğer (A) , Akciğer (B), Beyin (C) ve Böbrekteki (D) LDH seviyesi 12 saatte ve 24 saatte değişiklikleri.....	29
Şekil 4.2. Karaciğer (A) , Akciğer (B), Beyin (C) ve Böbrekteki (D) G6PDH seviyesi 12 saatte ve 24 saatte değişiklikleri.....	33

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. BHT özelliklerinin özeti.....	4
Çizelge 2.2. –2,6-Di-tert-butil-hidroksitoluen (BHT) ve bazı önemli türev metabolitleri.....	13
Çizelge 3.1. LDH analizini yapmak için deney ortam.....	24
Çizelge 3.2. G6PDH analizini yapmak için deney ortam.....	26
Çizelge 4.1. Karaciğer , Akciğer, Böbrek ve Beyin LDH ve G6PDH aktiviteleri (ortalama± standart hata).....	32

## 1 GİRİŞ

Geçmişteki yaşam tarzı bugünkü gibi değildi, her şeyden önce yeme alışkanlıklarımız değişti. Daha önceleri basit yaşıyor, organik ve doğal ürünler ile besleniliyordu. İnsanoğlu doğanın sunduğu her şeyi nasıl tüketmesi gerektiğini biliyormuş. Ancak artan insan sayısı ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte, yaşamımıza pek çok sentetik madde girmeye başladı. Bu yeni ürünler insan hayatını kolaylaştırdı.

Gelişen teknoloji, gıda üretim yöntemlerinin değişmesine neden olduğu gibi, gıdaların uzun süre bozulmadan saklanabilmesinin yolunu da açmıştır. Ancak bu durum yeni problemlerin açığa çıkmasına, gıda koruyucularının insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin oluşmasına neden olmuştur.

Gıdalarda kullanılan katkı maddelerinin arasında Sentetik Fenolik Antioksidanlar (SFA) önemli bir yer tutmaktadır. 2,6-di-tert-bütil-4-hidroksitoluen (bütildihidroksitoluen) (BHT), katı, sıvı yağlar ve kozmetikler dâhil olmak üzere çok çeşitli ürünlerde kullanılan bir antioksidandır (Wang ve Kannan, 2019, s. 24). SFA, tüketici güvenliğini sağlamak için gıdalarda ve kozmetiklerde sıklıkla kullanılmaktadır. Antioksidanların kullanımına izin verilen sınırlar, ülkeden ülkeye büyük farklılıklar göstermektedir (Reische, Lillard ve Eitenmiller, 1998; Yehye, Rahman, Ariffin, Abd Hamid, Alhadi, Kadir ve Yaeghoobi, 2015. s. 297).

Antioksidan özelliğinden dolayı BHT, gıda korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, yüksek dozlarda BHT'ye maruz kalan laboratuvar hayvanlarının bazı dokularında belirgin değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir (Thompson ve Bolton, 1991; Waseem ve kaw, 1994. s. 33).

Nieva-Echevarria, Manzanos, Goicoechea ve Guillén (2015, s.67) tarafından yapılan bir çalışmada, 14 farklı BHT metabolitinin insan sağlığı için kanser dâhil pek çok önemli tehlikeler oluşturabileceği öne sürülmüştür. Yüksek dozlarda BHT'nin, sentrilobüler nekroza, serum transaminaz aktivitesinin artmasına ve

karaciğerde kanamaya neden olduğu, ayrıca hepatokarsinogenezin promotörü olarak sıçan ve kedilerde hepatositlerin mitotik aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir (Powell, Connelly, Jones, Grasso ve Bridges, 1999; Yehye ve diğerleri, 2015. s. 298).

Anaerobik glikolizin önemli enzimlerden biri olan Laktat Dehidrojenaz (LDH) düzeyi, akut ve kronik hücre hasarının en önemli belirteçlerinden birisidir. Bu enzimin hücre dışı aktivitesi, oksidatif stres koşulları altında artar, çünkü hücre bütünlüğü lipid peroksidasyonu işlemi sırasında değişebilir. Pentoz fosfat metabolik yolunun solunum kontrol enzimlerinden olan Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (G6PDH), hücreleri ve hücre zarlarını oksidatif hasardan koruyan ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan bir enzimdir.

Bu çalışmanın amacı, BHT'nin sıçanların karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer dokularındaki LDH ve G6PDH aktiviteleri üzerindeki etkisini araştırmaktır.

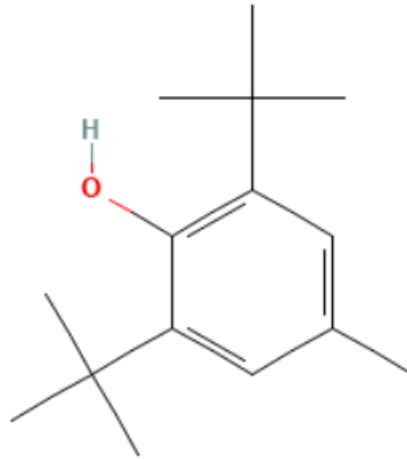
## 2 KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

#### 2.1.1 BHT'nin özellikleri ve kimyasal yapısı

BHT'nin resmi terminolojisi 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol'dür, di-tert-bütül-2,6 para-kresol, 3,5-di-tert-bütül-4 hidroksitoluen isimleri altında listelenen moleküller de vardır. BHT, orto pozisyonlarında iki tert-butil grubu bağlanmış, parakresolden (4-metilfenol) türetilmiş aromatik bir bileşiktir (Şekil 2.1).  $C_{15}H_{24}O$ , yaklaşık 220g/mol'lük bir moleküler kütleye karşılık gelir. Alkolde çözünür. Beyaz veya sarı kristaller halinde, toz şeklinde bulunan kokusuz bir katıdır. BHT, polar bir molekül değildir, molekül üzerindeki iki tane tersiyer bütül grubu, onu lipitte çözünür hale getirir. Bununla birlikte, tersiyer bütül grupları, antioksidan aktiviteyi de sınırlar. BHT'nin özellikleri çizelge 2.1 de verilmiştir.

BHT E-321 kodu ile gıda, kozmetik ve plastik endüstrilerinde katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılan sentetik bir fenolik antioksidandır. BHT, serbest radikallerin zincirleme tepkimesi sonucu oluşan lipidlerin oksidasyonuna karşı radikal süpürücü fonksiyon görerek gıdaları bozulmaktan korur (Lanigan ve Yamarik, 2002; Mean, Değer ve Yıldırım, 2018. s. 462).



**Şekil 2.1.** Bütillenmiş hidroksitoluenin yapısı ( $C_{15}H_{24}O$ )  
(National Center for Biotechnology Information, 2022).

**Çizelge 2.1.** BHT özelliklerinin özeti (Marilou, 2016). Düzenlemiş

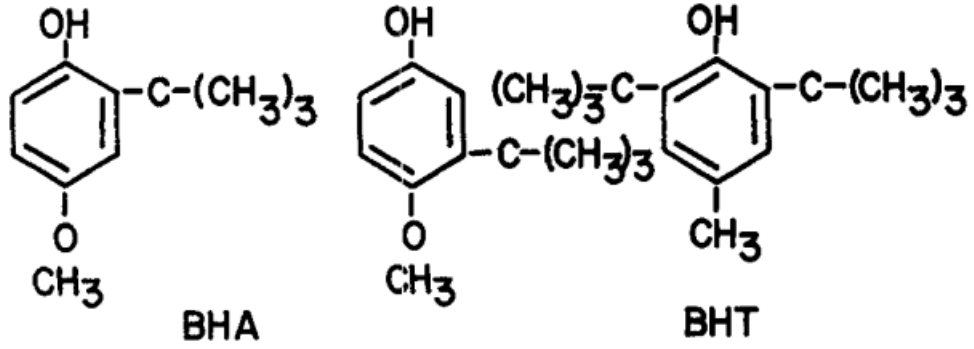
<b>IUPAC adı</b>	<b>-2,6di-tert-butil-4-metilfenol</b>
Eş anlamlı	<b>bütillenmiş hidroksitoluen -2,6di-t-bütül-p-kresol -2,6bis (1,1-dimetiletül)-4-metilfenol</b>
INCI	<b>BHT</b>
EINECS	<b>204-881-4</b>
Formül	<b>C15H24O</b>
Moleküler ağırlık	<b>220,34 g/mol</b>
Menşei	<b>Sentetik</b>
Fiziksel durum	<b>Katı; kristaller veya toz</b>
Renk	<b>Renksiz ila soluk sarı</b>
Koku	<b>Kokusuz</b>
Yoğunluk	<b>1,048 g/mL à 20°C</b>
Buhar yoğunluğu	<b>7,6</b>
füzyon noktası	<b>70 ° c</b>
Kaynama noktası	<b>265 ° C</b>
Alevlenme noktası(açık bardak)	<b>126,6° C</b>
Çözünürlük	<b>Suda az çözünür (0,6 ila 1,1 mg /) Propan-1,2-diol içinde az çözünür Etanolde ve yağ asitlerinde çözünür (yağda çözünür)</b>
20 ° C'de yoğunluk	<b>1,048 g/MI</b>
Log Pow	<b>5,1</b>
Gıda katkı maddesi numarası	<b>E321</b>
Gıdada gerekli olan saflık	<b>≥ 99%</b>
Safsızlıklar	<b>Arsenik ≤ 3 mg / kg Ağır metaller ≤ 10 mg / kg Kurşun ≤ 5 mg / kg Cıva ≤ 1 mg / kg</b>



### 2.1.2 BHT'nin sentezi ve kullanımı

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi “European Food Safety Authority” (EFSA) (2012) Paneli, BHT'nin yüksek saflıkta p-kresol (4-metilfenol) ve izobutilen (2-metilpropen) arasında bir alkilasyon tepkimesi ile elde edildiğini belirtmiştir. BHT ilk kez 1947'de petrol ve yapıştırıcı endüstrisinde endüstriyel bir antioksidan olarak kullanılmıştır (Witschi, Malkinson ve Thompson, 1989, s. 89). BHT; kara taşıtlarında ve havacılıkta kullanılan benzinlerde, yağlama, türbin ve izolasyon yağlarında, mumlar, sentetik ve doğal kauçuklar, boyalar, plastikler ve elastomerlerin, uzun süreli depolama işlemlerinde oksidasyondan koruyucu olarak kullanılmaktadır (Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD SIDS], 2002. s. 7). 1950'lerde ise BHT, gıda ve kozmetik endüstrilerinde katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1954'ten beri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıdalarda ve gıda ambalajlarında düşük dozlarda kullanım için onaylanmıştır (Hilton, 1989; Yehye ve diğerleri, 2015, s. 298). 1958'de Genel Olarak Güvenli Kabul Edilmiş (GRAS) statüsü almıştır. Çünkü kullanımından kaynaklanan o güne kadar herhangi bir olumsuz sonuç bildirilmemiştir.

BHT, ısıl işlem görmüş gıdaların profesyonel üretimi için katı ve sıvı yağlara, kızartma yağlarına (zeytin-prina yağı hariç), tek başına veya gallatlar, Bütillenmiş Hidroksianizol (BHA) veya Tert-Bütildidrokinon (TBHQ) ile birlikte 100mg/kg'a kadar eklenebilmektedir. Domuz yağında, balık yağında sığır yağında, kümes hayvanları ve koyun eti yağında da kullanılmaktadır (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 67). Ayrıca, sakız ve diğer bazı gıdalarda 400mg/kg'a kadar BHT'ye tek başına veya gallat ve BHA kombinasyonu halinde izin verilmektedir (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 67) (şekil 2.2).



Şekil 2.2. Butylenmiş Hidroksianisol (BHA) ve Butylenmiş Hidroksitoluen (BHT) (Branen, 1975)

### 2.1.3 Yönetmelikler

#### 2.1.3.1 Gıda mevzuatı

1987'de Tüketici Finansmanı Anketi (SCF), mutajenite çalışmaları, sıçanlarda ve farelerde kanserojen düzeyini belirleme çalışmaları, özel tiroid çalışmaları, kan, gelişim ve davranış, çeşitli türden doğum sonrası ve metabolik veriler dâhil olmak üzere BHT ile ilgili mevcut tüm çalışmaları gözden geçirerek, kabul edilebilir günlük alım miktarı (ADI) 0-0,05 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (EFSA, 2012, s. 1).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO-WHO) Uzman Komitesi (JECFA) (1996, s. 8), BHT'nin akciğerler, karaciğer, böbrekler, pıhtılaşma mekanizmaları üzerindeki etkileri, karsinogenez, üreme ve genotoksisitenin teşviki ile ilgili verileri değerlendirmiş, bu değerlendirmeye göre komite, BHT için ADI, 0-0,3mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu belirtmiştir. OECD (2002), sıçanların kronik oral maruziyeti sırasında karaciğer ve tiroid bezinin birincil hedef olduğunu belirtmiştir. Kronik maruziyet için gözlenebilir olumsuz etki göstermeyen doz (NOAEL) 25mg/kg vücut ağırlığı/gün BHT olarak kabul edilmektedir. BHT'nin olası kanserojen ve tümör yapıcı etkisi için 100mg/kg vücut ağırlığı/gün eşik değerinin kabul edilebileceği belirtilmiştir.

Nitekim, SCF 5mg/kg vücut kütlesi/gün gözlemlenebilir yan etkisi olmayan NOAEL maksimum bir doz bulmuş ve 100 güvenlik faktörünü, dolayısıyla yukarıda belirtilen değeri dikkate almayı uygun görmüştür (EFSA, 2012, s. 2).

### **2.1.3.2 Kozmetikte bulunan derişimler ve öneriler**

Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) veya asit sitrik gibi ayırıcı bir ajan ilavesiyle doymamış malzemeler içeren kozmetikler için optimal kullanım derişiminin %0,01-%0,1 olduğunu bildirmiştir. Flyvholm ve Menne (1990, s. 343), BHT'nin genellikle "tuvaletlerde" 200-1000ppm derişimlerde kullanıldığını ileri sürmüştür. Güneş koruyucularında 208-251µg/g miktarlarında BHT tespit edilmiştir. Dudak koruyucularında 189-195µg/g, 251µg/g el kremi içinde "anti age" ürünlerde 61-336g/g ve merhemde 63µg/g BHT bulunmaktadır (Irache, Vega ve Ezpeleta, 1992). BHT, çok çeşitli kozmetik formülasyonlarında antioksidan olarak %0,0002 - %0,5 arasında değişen derişimlerde kullanılmaktadır (Lanigan ve Yamarik, 2002 s. 21).

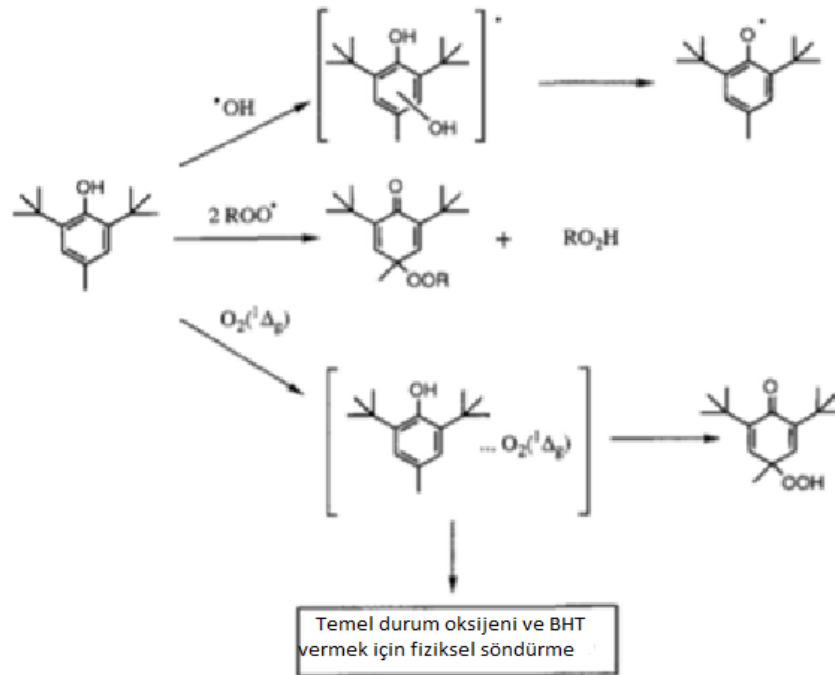
### **2.1.4 BHT'nin antioksidan özellikleri**

Serbest radikaller hücre hasarında hayati rol oynamaktadır. Serbest radikallerin etkisini azaltmak ve neden oldukları hasarı geciktirmek için birçok doğal ve sentetik antioksidan kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar en çok gıda, yem, kozmetik, biyomedikal, kauçuk ve plastik endüstrilerinde kullanılmaktadır.

En etkili antioksidanlar, serbest radikallerin zincirleme tepkimelerini engelleyenlerdir. Genellikle aromatik veya fenolik halkalar içeren bu antioksidanlar, oksidasyon sırasında oluşan serbest radikallere hidrojen verir ve kendileri bir radikal olurlar (Yehye ve diğerleri, 2015, s. 297).

BHT'nin antioksidan özellikleri moleküler konfigürasyonuna dayanmaktadır. BHT, diğer sentetik fenolik antioksidanlar gibi, hidroksi grubunda bağışlanabilen ve lipid oksidasyonunun başlama basamağı sırasında üretilen serbest radikalleri

azaltan kararsız bir hidrojen atomuna sahiptir. Böylece, BHT'nin kendisi oksitlenir ve sonraki türetilmiş radikal, benzen halkasında elektronik delokalizasyon ile stabilize edilir. BHT, lipidlerin oksidasyonunu geciktirebilir, gıdaların raf ömrünü uzatabilir ve radikal oksidasyonunun yayılmasını durdurabilir (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015; Warner, Brumley, Daniels, Joe ve Fazio, 1986). Tekli oksijen ( $O_2 (^1\Delta_g)$ ), hidroksil radikalleri ( $\bullet OH$ ) ve peroksit radikalleri ( $\bullet OOR$ ) gibi güçlü oksitleyici radikallere karşı etkili bir şekilde tepkimeye girdiği bildirilmiştir, ancak tepkime mekanizması reaktife bağlı olarak değişebilir (Lambert, Black ve Truscott, 1996; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 70).  $\bullet OH$  ile ilk tepkime mekanizması, kataliz tarafından takip edilen OH grubunun eklenmesini içerir. Bu, fenoksi tipi bir radikalın elde edilmesini ve suyun oluşmasını sağlar. İkinci mekanizma, iki  $\bullet ROO$  içerir (Şekil 2.3). İlk olarak, BHT ile radikallerden biri arasında bir kompleks oluşur. Kompleks, hidrojen transferi yoluyla ikinci radikali azaltır. Son mekanizma  $O_2$  ile ilgilidir. BHT ile tersinir bir kompleks oluşumunu da içerir (Lambert ve diğerleri, 1996).



**Şekil 2.3.** BHT'nin reaktif oksijen türevleri ile etkileşimleri (Boskou, 1999; Lambert ve diğerleri, 1996). Düzenlemiş

## **2.1.5 Emilim ve metabolizma**

### **2.1.5.1 Emilim ve dağıtım**

Emilim ağız yoluyla olabileceği gibi deri yoluyla da gerçekleşebilir. BHT, gastrointestinal sistemden ve az miktarda sağlam deriden kolayca emilir. BHT içeren diyetlerle uzun süreli beslenmeden sonra BHT özellikle yağ dokusunda birikirken, karaciğerde daha düşük düzeylerde bulunur (OECD SIDS, 2002. s. 12). BHT içeren kozmetik ürünlerin kutanöz uygulaması ile cildin BHT'yi emdiği gösterilmiştir (Ham, Lim, Whang ve Song, 2020. s. 6; Lanigan ve yamarik, 2002). Ek olarak, diş dolgu macunu kullanan kişilerin, kullanmayanlara göre daha yüksek seviyelerde BHT'ye maruz kalabileceyi ileri sürülmüştür (Ham ve diğerleri, 2020. s. 7; Wang, Kannan, Xue ve Kannan, 2016). BHT sindirim sistemi tarafından ise hızla emilir, daha sonra metabolizma için karaciğerde dağılır ve yağ dokusunda depolanır (Witschi ve diğerleri, 1989; Wang ve Kannan, 2019).

### **2.1.5.2 Metabolizma**

BHT, mikrozomal monooksijenaz sisteminin güçlü bir indükleyicisidir ve ana bozunma yolu, sitokrom P450 tarafından katalize edilen oksidasyondur (Conning ve phillips, 1986; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 71). Böylece, oksidasyon tepkimeleri ile metabolize edilen BHT, mikrozomal monooksijenaz sisteminin bir indükleyicisi iken, BHA dâhil diğer fenolik antioksidanlar sadece zayıf indükleyicilerdir (Conning ve phillips, 1986). 40'tan fazla BHT metaboliti tanımlanmıştır (EFSA, 2012, s. 13; JECFA, 1996; Matsuo Mihara, Okuno, Ohkawa ve Miyamoto, 1984). Çizelge 2.2 BHT'nin en önemli metabolitlerini göstermektedir. BHT'nin olası metabolik yolları, para-metil, tert-butil gruplarının oksidasyonu ve aromatik halka üzerinden olduğu açıklanmıştır (Zhang, Li ve Cui, 2020, s. 1).

BHT'nin metabolizması 2 ana yol'a gerçekleşir. Alkil sübstitüentlerinin ve benzen halkasının oksidasyonu (şekil 2.4): Alkil ikame edicilerin oksidasyonu ile ilgili olarak, BHT, p-metil grubunda veya her iki tert-butil grubunda oksidasyon

gösterebilir (Daniel, Gage ve Jones, 1968; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015, s. 72). Türler arasında metabolik farklılıklar rapor edilmiştir: Sıçanlar, tavşanlar ve maymunlar için ana metabolik yol p-metil grubunun oksidasyonu iken, insanlarda ve farelerde tert-butil gruplarının oksidasyonu baskındır (Conning ve phillips, 1986, s. 1145). Ana biyotransformasyon, p-metil grubunun oksidasyonudur ve tert-butil gruplarının oksidasyonu, sıçanlarda küçük bir tepki vermektedir (Matsuo ve diğerleri 1984). İnsanlarda birikimle ilgili olarak, BHT'nin farelere göre insanın yağ dokusunda daha yüksek değişimlere ulaştığı sonucuna varılmıştır (Conacher, Iverson, Lau ve Page, 1986; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 73). Doz/vücut ağırlığına göre insanın yağ dokusunda BHT birikimi sıçanlara göre daha yüksek görünmektedir (Anonim 2002; EFSA, 2012, s. 13; Madhavi, Deshpande ve Salunkhe, 1996); insanlarda, sıçanların aksine, önemli bir enterohepatik dolaşım gözlenmemiştir (EFSA, 2012; JECFA, 1996). Farelerde, BHT tercihen metabolizma ile ilgili organlarda (örneğin; karaciğer ve böbrekler) birikir, BHT ve metabolitlerin karaciğerde tercih edilen birikimi, potansiyel hepatotoksisite gösterir (Zhang ve diğerleri, 2020. s. 4). p-metil grubunun oksidasyonu meydana geldiğinde, BHT-COOH ana metabolit olarak kabul edilir ve karşılık gelen aldehit (BHT-CHO) ve alkol (BHT-CH<sub>2</sub>OH) aracılığıyla üretilir (Matsuo ve diğerleri, 1984; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 72); BHT-CHO'nun oksidasyonu da 2,6-Di-tert-butil-2,5-sikloheksadien-1,4-dion (BHT-Q)'ya neden olabilir (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015; Oikawa, Nishino, Oikawa, Inoue, Mizutani ve Kawanishi, 1998, s. 72). Ek olarak, sıçan karaciğerinde BHT-COOH'nin daha fazla metabolizması, 2,6-Di-tert-butil-4-fenol'ye (DBP) dekarboksilasyona ve ardından BHQ ve BHT-Q oluşumuna neden olabilir (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015, s. 72; Yamamoto, Tajima, Takemura ve Mizutani, 1991). Tert-butil gruplarının oksidasyonu gerçekleştiğinde BHT-OH ve türevi 2-Tert-butil-6-(2-hidroksi tert-butil)-4-metilen 2,5-sikloheksadien-1-on BHT-OHQM oluşabilir (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015, s. 72; Thompson, Carlson, Sun, Dwyer-Nield ve Malkinson, 2001). BHT'nin aromatik halkasının ikinci oksidasyon yolu ile ilgili olarak, bu diğerlerinin yanı sıra BHT-Q ve BHT-OOH'nin oluşumuna yol açabilir; sırayla, bunlar BHT-QM üretebilir (Becker,1969; Guyton, Bhan, Kuppusamy, Zweier, Trush ve Kensler,

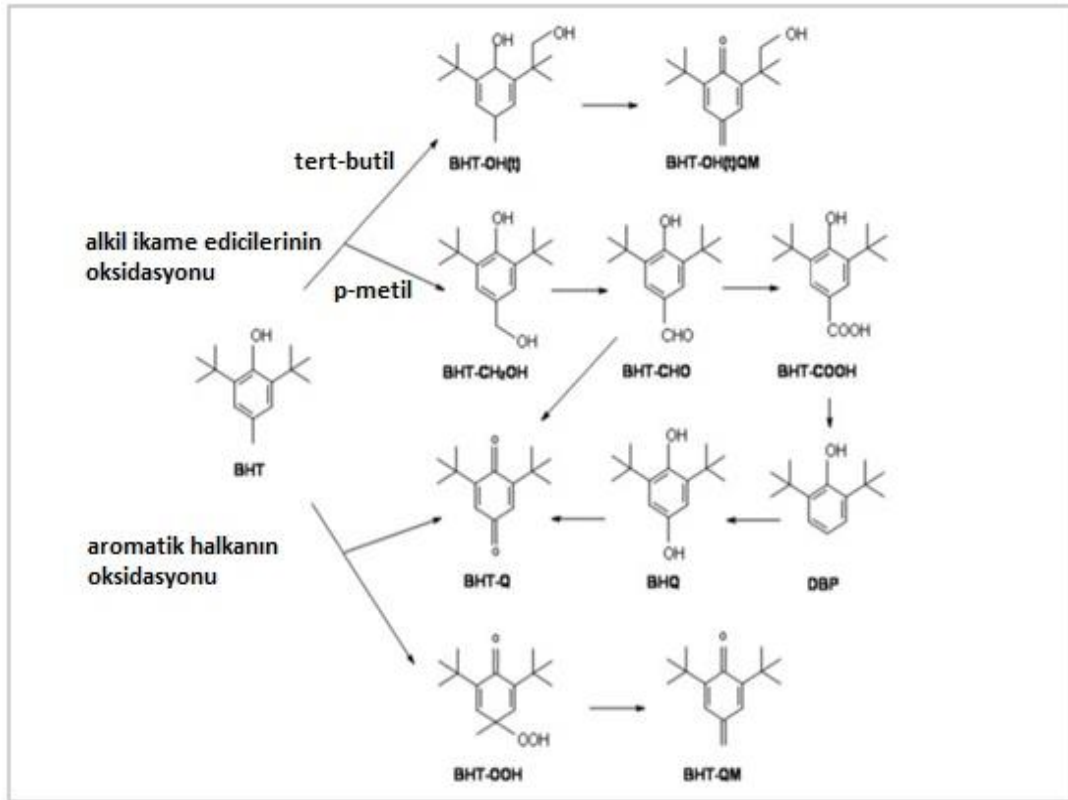
1991; Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015. s. 72). BHT'nin ana metabolitleri doku ve dışkıda bulunan BHT-quinol, BHT-COOH, BHT-Q, BHT-CHO ve BHT-OH'dir (Zhang ve diğerleri, 2020. S. 4). Zhang ve diğerleri, BHT-COOH, tüm dokularda BHT-kinol dışında baskın metabolittir ve BHT-COOH, esas olarak karaciğerde BHT-kinolün aksine böbreklerde ve kanda biriktiğini eklemiştir.

Sıçanlarda dört ana metabolit tanımlanmıştır: 3,5-di-tert-butil-4 hidroksi-benzoik asit (BHT asit), 2,6-di-tertbutil-4-hidroksimetilfenol (alkol BHT) ve 3,5- di-tert-butil-4 hidroksibenzaldehit (BHTaldehit) ve BHT kinon metid (2,6 di-tert-butil-4-metilen-2,5-sikloheksadien-1-on, BHTQM) (EFSA, 2012, s. 13; Madhavi ve diğerleri, 1996). BHT ve metabolitlerinin atılımı, insanlarda esas olarak idrarla atılırken, kemirgenlerde %50-80'i feçesle olur (Daniel, Gage, Jones ve Stevens, 1967; Daniel, 1986; Nieva-Echevarría, 2015. s. 72). Genel olarak, dışkı ve idrarla atılım, ksenobiyotiklerin atılımının iki ana yoludur (Ohtsu, Susaki ve Noguchi, 2018; Zhang ve diğerleri, 2020. s. 4).

Ayrıca BHT'nin atılımı ve metabolizması diğer sentetik fenolik antioksidanlar SFA'lerden daha yavaştır ve doku birikimi BHA'dan daha yüksektir (Conning ve Phillips, 1986; Ham ve diğerleri, 2020. s. 1). Matsuo ve diğerleri (1984), BHT'nin sıçanlardaki ana metabolitlerinin hem serbest formda hemde BHT-COOH şeklinde olduğunu kaydetmiştir. Glukuronid ve S-(3,5-di-tert.-butil-4-hidroksibenzil) -N-asetilsistein. Merkapturik asit, genel olarak kabul edilen enzimatik mekanizmadan türetilmiş gibi görünmemektedir ve serbest radikal BHT ile sistein arasında enzimatik olmayan bir tepkime içerebilir. Sıçan idrarında bulunan glukuronid ester ve merkapturik asit de sıçan safrasının ana metabolitleridir ve enterohepatik dolaşımdan sorumlu olduklarına inanılmaktadır. Serbest BHT asidi, sıçan dışkısının ana bileşenidir.

Başka bir çalışmada (Daniel ve diğerleri, 1968), insanlarda serbest ve konjuge BHT asidinin idrarda minör bir bileşen olduğunu ve merkapturik asidin hemen hemen hiç bulunmadığını kaydetmiştir.

Farelerdeki BHT-COOH boşaltım modelleri, sıçanlardakilerden önemli ölçüde farklıdır; fareler onu esas olarak idrarda glukuronid konjugatı olarak atarken, sıçanlar onu esas olarak dışkıda serbest asit olarak atmışlardır (Matsuo ve diğerleri, 1984). Serbest ve glukuronidlenmiş BHT-COOH, yetişkin insan idrarında tanımlanan ana metabolitlerdir (Holder, Ryan, Watson ve Wiebe, 1970; Wang ve Kannan, 2019. s. 27). Köpeklerde metabolizma, sıçanlarınkine benzerdir ve önemli safra atılımı gözlenmektedir. Maymunlarda majör metabolit BHT asit glukuroniddir ve atılım hızı insanlardakine benzerdir (EFSA, 2012, s. 13; Madhavi ve diğerleri, 1996).



**Şekil 2.4.** BHT'nin antioksidan ve prooksidan aktivitesi için önerilen tepkime yolları (Daniel 1986; Guyton ve diğerleri, 1991; Matsuo ve diğerleri, 1984; Nieva – Echevarría ve diğerleri, 2014, s. 72; Oikawa ve diğerleri, 1998; Thompson ve diğerleri, 2001; Rodil, Quintana ve Cela, 2012; Yamamoto ve diğerleri, 1991). Düzenlemiştir.



**Çizelge 2.2.** –2,6-Di-tert-butil-hidroksitoluen (BHT) ve bazı önemli türev metabolitleri (Nieva-Echevarría ve diğerleri, 2015). Düzenlemiş

Kısaltma	Sistematik isim	Yapı	Formül	CAS numarası
BHT	2 6-di-tert-butil-hidroksitoluen		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	128-37-0
BHT-CHO	3 5-di-tert-butil-4-hidroksibenzaldehit		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1620-98-0
BHT-COOH	3 5-di-tert-butil-4-hidroksibenzoik asit		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	1421-49-4
BHT-Q	2 6-di-tert-butil 2 5-sikloheksadien-1 4-dion		C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	719-22-2
BHT-QM	2 6-di-tert-butil 1-4 metilen 2-5 sikloheksadienon		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	2607-52-5
DBP	2 6-di-tert-butil-4-fenol		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	128-39-2
BHT-OH	2 6-di-tert-butil-4-hidroksi-4-metil 2,5 sikloheksadien-1-on		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	10396-80-2
BHT-CH <sub>2</sub> OH	3 5-di-tert-butil-4-hidroksibenzil alkol		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	88-26-6
BHT-OOH	2,6 di tert butil-4-metil-4-hidroperoksi,2,5-sikloheksadien-1-on		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	6485-57-0
TBP	2-tert-butil-4-metilfenol		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	2409-55-4
BHQ	2,6-di-tert-butil-1,4-benzendiol		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	2444-28-2
BHT-OH(t)	3-Tert-butyl-2-hydroxy-β,β,5-trimethylbenzeneethanol		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	112700-14-8
BHT-OH(t)QM	6-tert-Bütül-2-(hidroksi-tert-bütül)-4-metilen-2,5-siklohedandienon		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	124755-19-7
2-BHT	4 4'-etilenbis(2 6-di-tert-bütülfenol)		C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	1516-94-5
2-BHT-QM (stilbenekinin)	4 4'-etilenbis(2 6-di-tert-buty-2,5-sikloheksadien-1-on)		C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	809-73-4

### 2.1.6 Toksik etkileri

BHT'den etkilenen yerler arasında akciğerler, kalp, üreme organları, adrenal bezler, böbrekler ve karaciğer bulunmaktadır (Witschi ve diğerleri, 1989).

Genel olarak, SFA'ler ilk olarak insan tırnağında ölçülmüştür ve tırnaktaki yüksek derişimler, tırnakta biyolojik olarak birikme potansiyelleri nedeniyle SPA'lerin sağlık risklerine daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir. Hem BHT hem de BHA, 100ppm, kültürlenmiş miyokardiyal ve endoteloid hücrelerin hücre zarlarına zarar vererek belirgin LDH sızıntısına neden olur. Morfolojik kanıtlar, kültürlenmiş hücreler 1000ppm BHA veya BHT'ye maruz bırakıldığında önemli hücre lizizi göstermiştir. Yapılan bir çalışmanın sonuçları, nispeten yüksek derişimlerde BHT ve BHA'nın kültürde miyokardiyal hücrelere zarar verdiğini göstermektedir (Leslie, Gad ve Acosta, 1978).

BHT'nin farelerde akciğerde iltihap oluşumunu tetiklemekte ve malign melanomu artırma gibi toksikolojik etkileri indüklediği de ileri sürülmüştür (Bauer, Dwyer-Nield, Hankin, Murphy ve Malkinson, 2001; Le Gal, Ibrahim, Wiel, Sayin, Akula, Karlsson, Dalin, Akyürek, Lindahl, Nilsson ve Bergo, 2015; Zhang ve diğerleri, 2020. s. 2). Başka bir çalışma, ekstrapulmoner yolla uygulanan BHT'nin pulmoner toksisitesinin doza bağımlı olduğu ve aynı zamanda bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF)'nin hücresel ve biyokimyasal bileşenlerinde doku hasarının derecesinin değiştiği sonucuna varılmıştır (Waseem ve Kaw, 1994. s. 38).

BHT'nin ana toksik etkilerinden biri, BHT-kinon'un makromoleküllerle ilişkisinden kaynaklanan doku nekrozudur (Castro, Bracht, Comar, Peralta ve Bracht, 2017; Safer ve Al-Nughamish, 1999).

Ham ve diğerlerinin (2020) sonuçları, BHT'nin fare Leydig hücreleri üzerinde kalsiyum deregölasyonunun indüklenmesi ve ER mitokondri disfonksiyonu yoluyla toksik etkileri olduğunu göstermiştir.

BHT, in vivo olarak metabolize edildiğinde açığa çıkan metabolitler BHT'den daha toksiktir. BHT'den türetilen kinon, proteinlere kovalent bağlanma yoluyla

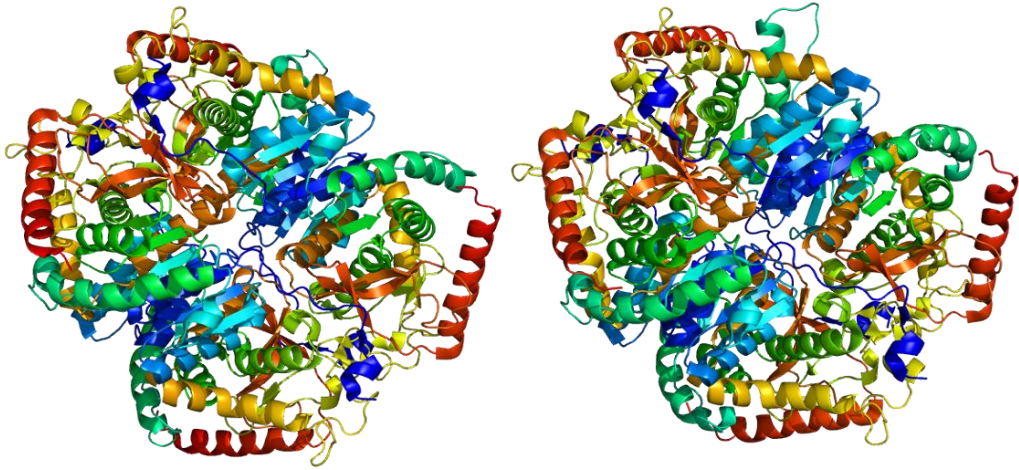
akciğerlerde (Guyton ve diğerleri, 1991; Zhang ve diğerleri, 2020. s. 2) ve deride (Lemercier, Meier, Gomez ve Thompson, 2004; Zhang ve diğerleri, 2020. s. 2) tümör oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür. Hayvan modellerinde BHT metabolitlerinin hücrel DNA hasarı, genotoksisite ve kanserojeniteye neden olduğu da gösterilmiştir (Oikawa ve diğerleri, 1998; Wang ve Kannan, 2019. s. 24). BHT-OOH DNA hasarına neden oldu (proto-c-Ha-ras-1 onkogeninden ve p53 tümör baskılayıcı genden elde edilen 32P etiketli DNA), NADH ve Cu(II) varlığında BHT-kinon kaynaklı DNA hasarı meydana gelir (Oikawa ve diğerleri, 1998).

BHT-CHO ve 2,6-di-tert-butilsikloheksa-2,5-dien-1,4-dion gibi BHT'nin belirli metabolitleri (BHT -Q), BHT'nin kendisinden daha toksik olduğu bildirilmiştir (Nagai, Ushiyama ve Kano, 1993; Wang ve Kannan, 2019. s. 24).

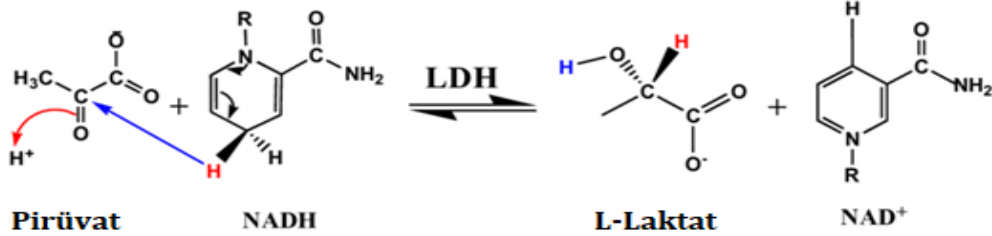
Daha resmi olarak, kendisine sunulan tüm bilgilere dayanarak, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), 1986 yılında BHT'nin hayvanlar üzerinde kanserojen etkileri olabileceğini, ancak insanlar için herhangi bir veri bulunmadığını belirlemiştir. Ajans bu nedenle BHT'yi grup 3'te sınıflandırmıştır. İnsanlar için kanserojenlikleri açısından sınıflandırılmayan maddeleri içeren bir kategoridir (EFSA, 2012, s. 23; Williams, Iatropoulos ve Whysner, 1999).

## 2.2 Laktat dehidrojenaz (LDH) EC 1.1.1.27

LDH vücuttaki hemen hemen her hücrede yaygın olarak bulunur (Acharya, Kale, Hallikeri ve Desai, 2018, s. 2; Joshi, Chougule, Dudanakar ve Golgire, 2012). LDH; piruvatın laktata tersinir dönüşümünü katalizeleyen tetramerik bir proteindir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Baumgart, Fahimi, Stich ve Völkl, 1996). LDH'nin moleküler ağırlığı 134 kDa'dır (Alkhatib ve Alrakaf, 2019, s. 415).



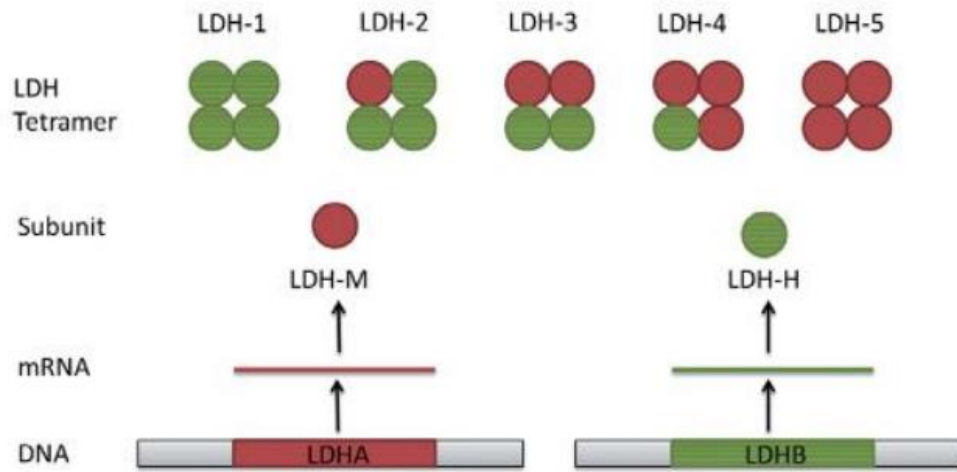
Şekil 2.5. Laktat dehidrojenaz'ın yapısı.



Şekil 2.6. Laktat dehidrojenaz tarafından katalize edilen geri dönüşümlü tepkime (Khan, Allemailem, Alhumaydhi, Gowder ve Rahmani, 2020).

LDH molekülü, kas (M) ve kalp (H) tipinde dört polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir. M zinciri, sırasıyla 11p15,4 ve 12p12,2 - p12,1 kromozomları üzerinde bulunan LDHA geni ve H, LDHB geni tarafından kodlanır. Böylece M

ve H zincirlerinin beş farklı kombinasyonu sonucunda beş izoenzim üretilir. LDH-1 (H<sub>4</sub>) dört H alt biriminden ve LDH-5 (M<sub>4</sub>) dört M alt biriminden oluşur LDH-2, LDH-3 ve LDH-4, MH<sub>3</sub>, M<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ve M<sub>3</sub>H izoenzimlerine karşılık gelir (Şekil 2.7). LDH molekülündeki M alt birimlerinin miktarı arttıkça, piruvatın laktata dönüşümünü katalize etme yeteneği de artar. Buna karşılık, baskın H izoenzimleri, örneğin kalp kasında meydana gelen bir süreç olan laktatın piruvata ters dönüşümünü katalize eder. Oksijenli koşullar altında, laktat ve NAD<sup>+</sup> oksidatif fosforilasyona giren piruvata geri dönüştürülür (Koukourakis ve Giatromanolaki, 2019, s. 409).



**Şekil 2.7.** LDH izoenzimlerinin bileşimi (Valvona, Fillmore, Nunn ve Pilkington, 2016).

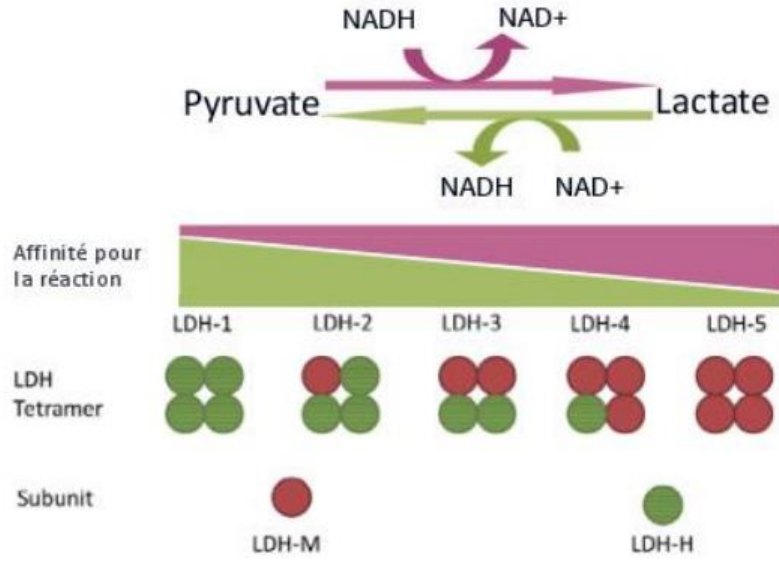
Alt birimden bağımsız olarak aktif merkez şunlardan oluşur (Holmes ve Goldberg, 2009):

- ✓ bir protonu destekleyebilen histidin 193
- ✓ koenzim görevi gören arginin 99 ve asparagin 138
- ✓ substratı bağlayan arginin 106, arginin 169 ve treonin 248.

M alt birimlerinin piruvat için daha büyük bir afinitesi vardır ve bu nedenle onu laktata daha kolay katalize edeceklerdir - tıpkı NADH'yi NAD<sup>+</sup>'ya daha kolay oksitleyecekleri gibi (Kerbiriou, 2018, s. 20). Öte yandan, H alt birimlerinin laktat için daha büyük bir afinitesi vardır ve karşıt tepkimeleri daha kolay katalize eder

(laktattan piruvata ve NAD<sup>+</sup> NADH'ye (Kerbiriou, 2018, s. 20; Read, Winter, Eszes, Sessions ve Brady, 2001)) (Şekil 2.8).

Başka bir deyişle, H alt birimlerinden daha zengin olan LDH1, laktatın piruvata dönüşümünü katalize etme olasılığı en yüksek alanıdır, LDH5 ise tam tersine M alt birimlerinden en zengin olanıdır ve daha ziyade zıt tepkimesi katalize edecektir (Kerbiriou, 2018, s. 21) (Şekil 2.8 ).



**Şekil 2.8.** Enzim katalizli tepkimele için farklı LDH izomerlerinin afinitesi (Valvona ve diğerleri, 2016).

LDH hücrenin sitoplazmasında bulunur ve hücre öldüğünde hücre dışına çıkmaktadır. LDH seviyeleri her dokunun gelişim, biyolojik koşullar ve patolojik yönler gibi metabolik ihtiyaçlarına göre değişir ve izoenzim yapısı başka dokularda farklılık gösterir (Alkhatib ve Alrakaf, 2019, s. 415).

LDH aktivitesi tipik olarak, ya NADH'nin piruvat ile oksidasyonu ya da NAD'nin laktat ile azalması takip edilerek 340nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Markert, 1984).

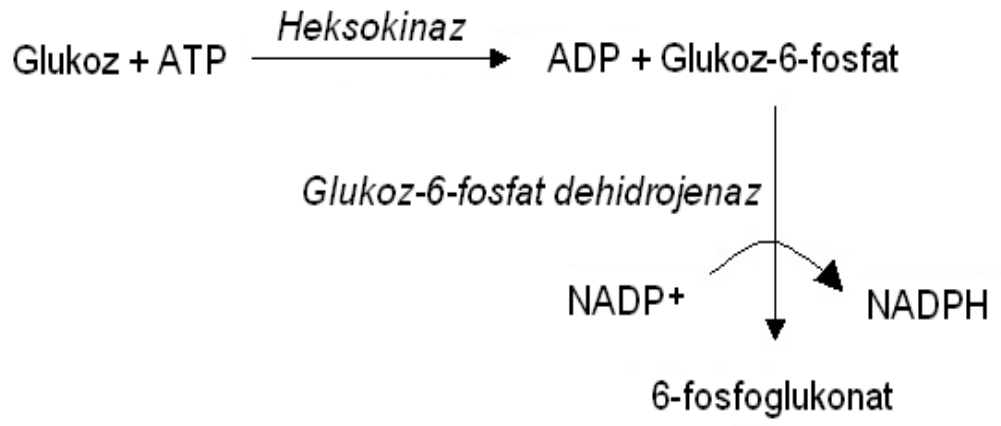
### 2.3 Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH)

Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enzimi, pentoz fosfat metabolik yolundaki en önemli enzimlerden biridir. G6PDH, glikoz-6-fosfatı, nükleik asit sentezi için glikozu pentoz şekerlerine dönüştüren pentoz fosfat yolundaki ilk adım olan 6-fosfoglukonolaktona dönüştürür (Şekil 2.9). Bu adım, hücreleri oksidatif strese korumak için gerekli olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADP<sup>+</sup>) eş zamanlı olarak indirgenmiş formuna NADPH dönüşmesine izin verir (Belfield ve Tichy, 2018, s. 70). G6PDH her hücrede bulunmasına rağmen, eritrositlerde pentoz fosfat tek NADPH kaynağı olduğu için G6PDH eksikliği hematolojik etkilerle sonuçlanır (Belfield ve Tichy, 2018, s. 70).

G6PDH, Xq28 bölgesine karşılık gelen ve dizisi evrim boyunca yüksek oranda korunmuş olan X'e bağlı bir gendir (Au, Gover, Lam ve Adams, 2000; Ho, Cheng ve Chiu, 2005; Stanton, 2012, s. 363). Gen, 13 ekson ve 12 introndan oluşur; memeli hücrelerinde eksprese edilen protein, bir dimer veya tetramer olarak aktiftir, (Au ve diğerleri, 2000). Protein 514 amino asitten oluşur ve NADP ve G6P için bağlanma bölgelerinin yanı sıra dimeri stabilize etmek ve böylece proteini aktif bir konformasyonda tutmak için hareket eden NADP için bir allosterik değiştirici bağlanma bölgesine sahiptir (Au ve diğerleri, 2000).

Normal veya neoplastik hücre büyümesi geçiren hücrelerde G6PDH aktivitesinin arttığı uzun zamandır bilinmektedir (Kletzien, Harris ve Foellmi, 1994).

Normal veya neoplastik hücre büyümesi altında G6PDH aktivitesinin artmasının nedeni, nükleik asit sentezi için riboz-5-fosfat sağlamak olduğu ve hücre büyümesi ile ilgili olduğudur (Stanton, 2012).



Şekil 2.9. G6PDH'in tepkimesi



### **3 MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Kimyasal maddeler ve kitler**

- BHT
- LDH aktivite ölçüm kiti, BioVision
- G6PDH aktivite ölçüm kiti, BioVision
- Mısır yağı, BioVision

##### **3.1.2 Sarf malzemeler**

- 96 kuyulu mikrolaka, NEST Biotechnology
- 2 ml hacimli santrifüj tüpleri, ISOLAB
- 2 ml hacimli EDTA'lı tüpler, Vacutest
- 1000 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 200 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 10 µl'lik pipet uçları, SSIBio
- 5 cc enjektörler,
- 1 ml insülin enjektörü, 100 ml enjektörü
- Serolojik pipet (5ml, 10ml, 25ml)

##### **3.1.3 Cihazlar**

- Hassas terazi, Sartorius
- Homojenizatör, Schuett homgenplus, yarı otomatik homojenizatör
- Santrifüj, HERMLE Z 326 K soğutmalı santrifüj 17
- Vorteks, VELP Scientifica
- Mikropleyt okuyucu BioTek ELx800
- pH metre, Sartorius PP-15
- Derin dondurucu, Arçelik
- 10 µl otomatik pipet, Eppendorf
- 10-100 µl otomatik pipet, MICROLİT
- 100-1000 µl otomatik pipet, ISOLAB
- Microfuger 16 sentrifüj, Beckman Coulter

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Deney Hayvanları**

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde yetiştirilmiş 200–250 gr ağırlığında Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Etik kurul raporu, hayvan deneyleri yerel etik kurulunun 28.01.2014 tarih 1/10-2014 sayılı numarası ile alınmıştır. Hayvanlar kontrol ve deney gruplarına ayrılarak su ve yeme ulaşımının serbest olduğu ortamda, 22-24 °C koşullarında tutulmuştur. Her çalışma saatinde deney grubu ve kontrol grubu için 3'er sıçan kullanılmıştır. Çalışmada (n=3) toplam 23 sıçan ele alınmıştır.

### **3.2.2 BHT'ye Maruziyetinin Gerçekleştirilmesi**

24 saat aç bırakılan hayvanlara, mısır yağında çözülmüş BHT'nin 125, 250 ve 500 mg/kg dozları intraperitoneal (i.p) yolla uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise aynı yolla mısır yağı verilmiştir. Meydana gelebilecek değişiklikleri takip edebilmek için enjeksiyondan 12 ve 24 saat sonra sıçanlar servikal dislokasyon yolu ile öldürülerek hayvanlardan karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin dokuları süratle çıkarılmıştır.

### **3.2.3 Doku Örneklerinin Toplanması**

Dokular soğuk pH=7,4 fosfat tamponu çözeltisi içinde yıkanmış, yaş ağırlıklar hassas terazide tartılmıştır. Dokular, 1/3(w/v) olacak şekilde soğuk tampon çözelti (50mM Tris-HCl, pH=7,5, 5mM EDTA ve 1mM DTT) içerisinde Schuett homgenplus homojenizatöründe 2000devir/dak hız durumunda homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemleri buzlar içerisinde yapılmıştır. Ele geçen homojenat 10 000g'de 15dak. HERMLE Z 326K soğutmalı santrifüjde çevrilmiştir. Santrifüj işlemlerinin 0-4°C de yapılmasına özen gösterilmiştir. Elde edilen süpernatantlar deney ortamında enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Homojenatların total protein değerleri Bradford yöntemine göre yapılırken,

aktivite tayinleri Mikorpleyt okuyucu, Bio Tek El×800 marka spektrofotometrede yapılmıştır.

### 3.2.4 LDH Aktivite Ölçümü

#### **Deney prensibi:**

LDH enziminin tepkime hızı, pirüvatın laktata dönüşümü esnasında oksidasyona uğrayan NADH'ın 340nm dalga boyunda azalan absorbansı kaydedilerek saptanmıştır.

Birim zaman başına 340nm'de optik yoğunluktaki değişiklik, LDH aktivitesinin bir ölçüsüdür.



Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri yerel etik kurulu, çalışmamıza etik kurul raporu vermiş. Bir ünite enzim, 340nm'de 1µmol NADP<sup>+</sup>'yi (NAD<sup>+</sup>'ı) 1 dakikada NADPH'a (NADH'a) (molar soğurma katsayısı 6,22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) değiştiren enzim miktarı olarak tanımlanırken, spesifik aktivite mg protein başına düşen uluslararası ünite olarak tanımlanmış.

#### **Çözeltiler:**

- I. Fosfat tamponu, 0,1M; pH= 7,0 (530 mg. KH<sub>2</sub>P<sub>04</sub> + 1,39g. K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>. 3 H<sub>2</sub>O/100 ml.)
- II. Sodyum piruvat solüsyonu, 23mM ( 25mg. Sodyum piruvat / 10ml.)
- III. NADH çözümü, yakl. 12mM (100mg. NADH, Na<sub>2</sub>-tuz/ 10ml.)

Numune (5 mg./ml., buz gibi soğuk fosfat tamponu (I) ile 1:1000 seyreltilmiş) (Boehringer Mannheim GmbH, 1987).

### Spektrofotometrik ölçüm

Dalga boyu: 340nm; ışık yolu: 1cm; nihai hacim: 3,00ml.; sıcaklık : 25 °C .

#### Çizelge 3.1. LDH analizini yapmak için deney ortam

küvete pipet:		Test karışımındaki konsantrasyon
Fosfat tamponu (I)	2,83ml	94mM
Sodyum piruvat çözeltisi (II)	0,10ml	7,6mM
NADH çözeltisi (III)	0,05ml	0,2Mm
karışım, ilave edilerek reaksiyon başlatılır:		
Örnek	0,02ml	
Karışım, optik yoğunluk 1,2,3,4 ve 5 dakika sonra okundu. Ölçülen $\Delta E/min$ değerlerden ortalama hesaplandı.		

### Hesaplama:

Bradford (1976) yöntemi ile protein tayini yapıldı.

$$Volum\ aktivite = \frac{3,00}{\epsilon \times 1,0 \times 0,02} \Delta E/min \times [U/ml.\ örnek]$$

(  $\epsilon_{340} = 6,22$  ;  $\epsilon_{334} = 6,0$  ;  $\epsilon_{366} = 3,3$  [  $cm^2 / \mu mol$  ] )

$$Spesifik\ aktivite = \frac{Volum\ aktivite}{derişim} [U/mg.\ protein]$$

### 3.2.5 G6PDH Aktivite Ölçümü

G6PDH aktivitesinin belirlenmesinde Triethanolamin tamponu (pH=7,6. 0,1 M), MgCl (0,1 M), Glukoz 6-fosfat (0,1 M), NADP+ (11 mM) karışımı kullanılmıştır. Triethanolamin Tamponu, MgCl, ve BHT Merck firmasından sağlanırken, NADP<sup>+</sup>, NADH, Glukoz 6-fosfat Sigma firmasından sağlanmıştır.

#### **Deney prensibi:**

G6PDH enzim aktivitesi, Glukoz 6-fosfatın glukonat 6-fosfata dönüşümü esnasında oluşan NADPH'ın artan absorbans değerleri izlenerek enzim aktivitesi tayinleri belirlenir.

Birim zamanda 340nm'de optik yoğunluktaki değişiklik, G6PDH aktivitesinin bir ölçüsüdür.

#### **Çözeltiler:**

I. Trietanolamin tamponu, 0,1M; ph=7,6 (1,86g. trietanolamin hidroklorür/100ml., 1 N NaOH ile pH=7,6'ya ayarlanmış)

II. Magnezyum klorür çözeltisi, 0,1M (2,0g. MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O/100ml.)

III. Glukoz-6-P solüsyonu, 35mM (10mg. glukoz-6-P, Na-tuz/ml.)

IV. NADP solüsyonu, yaklaşık 11mM (10mg. NADP, Na-tuz/ml.)

Numune (1mg.enzim süspansiyonu/ml., ölçümden hemen önce buz gibi soğuk trietanolamin tamponu (I) ile 1:10 oranında seyreltildi) (Boehringer Mannheim GmbH, 1987).

#### **Spektrofotometrik ölçüm:**

Dalga boyu: 340nm; ışık yolu: 1cm; nihai hacim: 3,00ml.; sıcaklık : 25 °C ;

**Çizelge 3.2.** G6PDH analizini yapmak için deney ortamı

küvete pipet:		Test karışımındaki konsantrasyon
trietanolamin tamponu (I)	2,59ml	86,3mM
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (II)	0,20ml	6,7mM
glukoz-6-P çözeltisi (III)	0,10ml	1,2mM
NADP çözümü (IV)	0,10ml	0,37mM
karışım, ilave edilerek reaksiyon başlatılır:		
Örnek	0,01ml	
Karışım, optik yoğunluk 1,2,3,4 ve 5 dakika sonra okundu. Ölçülen $\Delta E/\text{min}$ değerlerden ortalamayı hesaplandı.		

### Hesaplama:

Bradford (1976) yöntemi ile protein tayini yapıldı.

$$Volum\ aktivite = \frac{3,00}{\epsilon \times 1,0 \times 0,01} \Delta E / \text{min} \times [U / \text{ml. örnek}]$$

$$(\epsilon_{340} = 6,22 ; \epsilon_{334} = 6,0 ; \epsilon_{366} = 3,3 [cm^2 / \mu\text{mol}])$$

$$Spesifik\ aktivite = \frac{Volum\ aktivite}{derişim} [U / \text{mg. protein}]$$

### 3.2.6 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 9.3.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve deney grupları 12 saat ve 24 saat arasındaki farklar, iki yönlü varyans analizler yapılmıştır (Two-way ANOVA). Sonuçlar ortalama değer ve standart hata (SH) olarak ifade edilmiştir. Farklar,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  ve  $p < 0,001$  örneğinde anlamlı kabul edilmiştir.

## 4 BULGULAR

Çalışmamızda 125mg/kg, 250mg/kg ve 500mg/kg BHT maruziyetinin LDH ve G6PDH enzimleri üzerine etkileri karaciğer, akciğer, böbrek ve beyin örneklerinde incelenmiştir. Çalışılan her bir zaman diliminde (12, 24 saat) kontrol grubunda n=3 deney grubunda n=3 hayvan kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ve standart hata (Ort ± SH) şeklinde verilmiştir (Çizelge 4.1).

### 4.1 LDH Bulguları

#### 4.1.1 Karaciğerde LDH aktivitesi

Şekil (4.1A), BHT değişimine bağlı olarak 12 ila 24 saat arasındaki karaciğerdeki LDH seviyesini göstermektedir. 12 saat sonra karaciğerdeki kontrol LDH seviyesinin ( $9,7 \times 10^{-1}$  U/mg protein) ve 24 saat sonra ( $11,7 \times 10^{-1}$  U/mg protein) olduğu ortaya çıkmıştır. 125 mg/kg BHT verildikten sonra enzim düzeyi 12 saat sonra yükselirken, 24 saat sonra azalmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuş ( $p>0,05$ ). 250 mg/kg BHT dozu uygulandığında, 12 saatte ve 24 saatte LDH düzeyinde kontrol aktivitesine göre azalma gözlenmiştir. 24 saatteki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0,01$ ). Bu azalma %36,18 olarak hesaplanmıştır. 500mg/kg BHT enjekte edilen grupta ise 12 saat ve 24 saat boyunca LDH seviyesinde kontrol seviyeye göre daha fazla düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu azalmalar 12 saatte %35,14 ve istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ). 24 saatte %56,35 olmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ).

#### 4.1.2 Akciğerde LDH aktivitesi

Şekil (4.1B), farklı dozlarda BHT verildiğinde 12 saat ve 24 saat boyunca akciğerdeki LDH seviyesini göstermektedir. Akciğerdeki kontrol LDH düzeyi 12 saat içinde ( $1,2 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) ve 24 saat içinde ( $1,23 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) olmaktadır. 125 mg/kg BHT derişiminde uygulanmasında hem 12 hemde 24 saat sonra LDH seviyesinde bir azalma görülmüştür. 250 mg/kg BHT derişiminde enzim seviyesinde kontrol gruplarına göre bir azalma görülmekle beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ). 500 mg/kg BHT

derişimi ile enzim seviyesinde 24 saattebasit bir artış görülmüştür. 12 saatte, LDH aktivitesini kontrol grubuna göre aynı değerde kalmıştır.

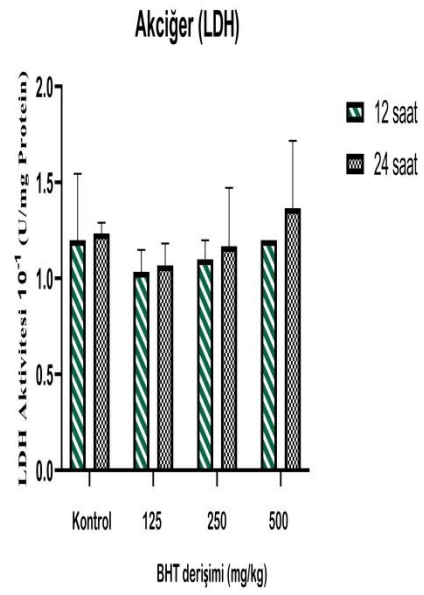
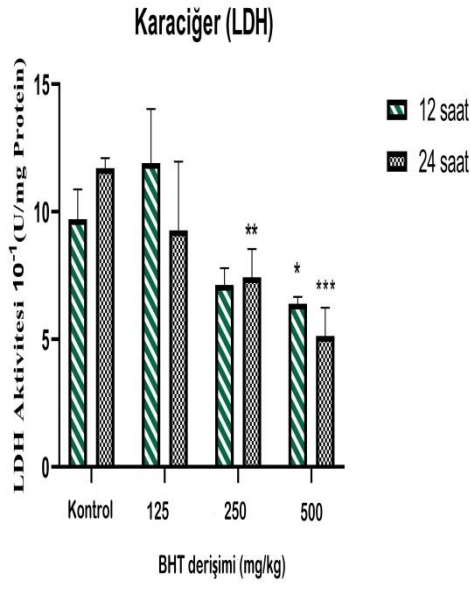
#### **4.1.3 Beyin LDH aktivitesi**

12 ve 24 saatlerde BHT'nin farklı dozlarının uygulanmasından sonuç beyindeki LDH seviyesindeki değişimler Şekil 4.1C de gösterilmiştir. Enzimin kontrol seviyesinin 12 saatte ( $1,6 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $1,8 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) olduğu bulunmuştur. 125 mg/kg BHT derişiminde, LDH seviyesinin 12 saatte bir miktar arttığı, 24 saatte ise hemen hemen normal değerlerde olduğu görülmektedir. BHT derişiminin 250mg/kg ve 500mg/kg'a yükselmesiyle, 12 saatte LDH'nin aktivitesinde önemli bir değişiklik ortaya çıkmaktadır. Enzim aktiviteleri artar, yaklaşık 1,3 katı yükselmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Bu artışlar 250mg/kg'de %43,56 olurken 500 mg/kg'de %42,66 olmaktadır. 24 saatte, kontrol grubuna göre basit bir artış görülmüştür.

#### **4.1.4 Böbrek LDH aktivitesi**

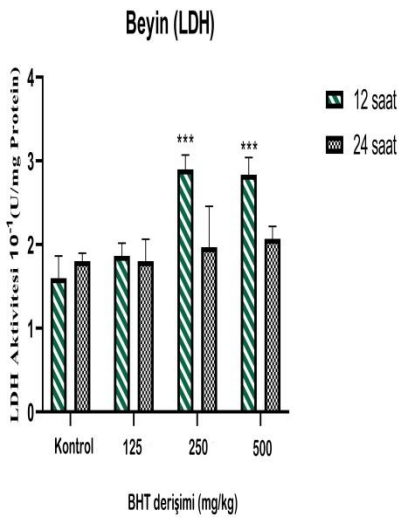
Şekil (4.1D), BHT'nin derişimleri 12 ve 24 saatte böbreklerdeki LDH aktivitesindeki değişikliği göstermektedir. Böbreklerdeki kontrol LDH düzeyi 12 saatte ( $2,8 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $2,4 \times 10^{-1}$  U/mg.protein) olmaktadır. 125 mg/kg BHT derişiminde, 12 saatte ve 24 saatte LDH'de önemli bir düşüş olmaktadır. 12 saatte bu azalma %43,01 olmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). 250mg/kg BHT derişiminde, enzim düzeyinde kontrol düzeyine göre 12 saatte belirgin bir azalma görülmüş ve bu azalma %33,42 olarak hesaplanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). 24 saatte LDH seviyesi kontrol seviyesine göre değişmemiştir. 500mg/kg BHT derişiminde, saat 12'de enzim aktivitesinin kontrol seviyesiyle hemen hemen aynı olduğu bulunmuştur. 24 saatte ise önemli bir yükseliş görülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).



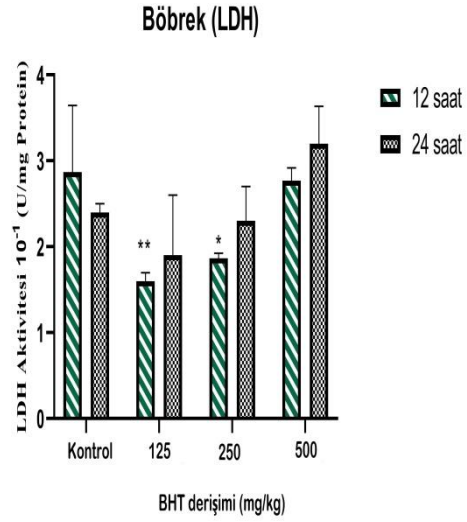


**A**

**B**



**C**



**D**

**Şekil 4.1.** Karaciğer (A), Akciğer (B), Beyin (C) ve Böbrekteki (D) LDH seviyesi 12 saatte ve 24 saatte değişiklikleri.

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  ve \*\*\* $p < 0,001$  BHT uygulanan gruplar kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır.

## **4.2 G6PDH Bulguları**

### **4.2.1 Karaciğer G6PDH aktivitesi**

Şekil (4.2A), BHT derişimine bağlı olarak 12 ve 24 saatte karaciğerdeki G6PDH seviyesini göstermektedir. G6PDH'nin kontrol aktivitesinin 12 saatte ( $2,2 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $2,4 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) olduğu görülmektedir. 125mg/kg BHT derişiminde G6PDH aktivitesinde bir artış gözlemlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). 250mg/kg BHT derişiminde, G6PDH aktivitesinin 12 saatte kontrol seviyeden düştüğü gözlenmiş ve 24 saatte ise kontrol değerleri yaklaşık aynı değer olmuştur. 500mg/kg BHT derişiminde enzim aktivitesinde önemli bir düşüş gözlemlenmiş. Bu azalmalar 12 saatte %35,87 olurken 24 saatte %34,15 olmuştur.

### **4.2.2 Akciğer G6PDH aktivitesi**

BHT derişimlerine göre G6PDH aktivitesindeki değişimler zaman bağlı (12, 24 saat) değişimleri Şekil 4.2B de gösterilmiştir. G6PDH'nin akciğerdeki kontrol aktivitesinin 12 saatte ( $4,7 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $4,9 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) olduğu görülmektedir. 125 mg/kg BHT derişiminde 12 saatte G6PDH aktivitesinde bir düşüş gözlenmekle beraber 24 saatte aktivitede %50,40 kadar bir azaltma görülmektedir. 250mg/kg BHT enjekte edilen grupta ise enzim aktivitesinin kontrol seviye ile hemen hemen aynı değerler olduğu görülmüştür. 500mg/kg BHT enjekte edilen grup G6PDH aktivitesinde 12 saatte %40,42 bir azalma olurken bu azalma 24 saatte %21,22 kadar olmuştur.

### **4.2.3 Beyin G6PDH aktivitesi**

12 ve 24 saatte beyindeki G6PDH aktivitesindeki değişimler Şekil 4.2C göstermektedir. Enzimin kontrol seviyesinin 12 saatte ( $4,63 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $4,53 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) olmaktadır. Çalışılan her 3 BHT derişiminde (125mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg) G6PDH aktivitelerinin kontrol değerleri ile hemen hemen aynı olduğu görülmektedir.

#### **4.2.4 Böbrek G6PDH aktivitesi**

Şekil (4.2D), farklı BHT derişimleri ile 12 ve 24 saatte böbreklerdeki G6PDH seviyesini göstermektedir. G6PDH'nin kontrol seviyesinin 12 saatte ( $2,56 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) ve 24 saatte ( $2,33 \times 10^{-3}$  U/mg.protein) olduğu hesaplanmaktadır. 125mg/kg BHT derişiminde 12 saatte G6PDH seviyesi değişmemiştir. 24 saatte yükselmiş, ancak istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p > 0,05$ ). Çalışılan diğer BHT derişimlerine gerek 12 saatte 24 saatte G6PDH aktivitesinin kontrol değerlerine göre düşüş ve çıkışlar göstermesine rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamsız görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

**Çizelge 4.1.** Karaciğer, Akciğer, Böbrek ve Beyin LDH ve G6PDH aktiviteleri (ortalama  $\pm$  standart hata)

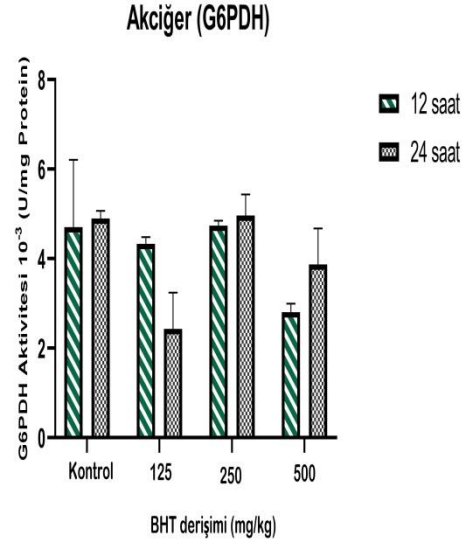
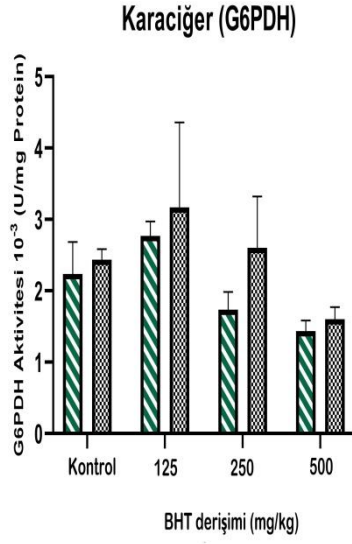
Enzim	Deney	Akciğer		Beyin		Böbrek		Karaciğer	
		12 Saat Ort $\pm$ SH	24 Saat Ort $\pm$ SH	12 Saat Ort $\pm$ SH	24 Saat Ort $\pm$ SH	12 Saat Ort $\pm$ SH	24 Saat Ort $\pm$ SH	12 Saat Ort $\pm$ SH	24 Saat Ort $\pm$ SH
G6PDH	Kontrol	4,7 $\pm$ 0,089	4,9 $\pm$ 0,13	4,63 $\times$ $\pm$ 0,33	4,53 $\pm$ 0,21	2,56 $\pm$ 0,87	2,33 $\pm$ 0,07	2,2 $\pm$ 0,24	2,4 $\pm$ 0,11
	125mg/kg	4,3 $\pm$ 0,10	2,43 $\pm$ 1,7	4,5 $\pm$ 0,10	4,3 $\pm$ 0,57	2,5 $\pm$ 0,05	3,13 $\pm$ 1,5	2,76 $\pm$ 0,08	3,16 $\pm$ 0,69
	250mg/kg	4,7 $\pm$ 0,00	4,96 $\pm$ 0,26	4,4 $\pm$ 0,07	4,26 $\pm$ 0,17	2,16 $\pm$ 0,12	2,5 $\pm$ 0,30	1,73 $\pm$ 0,10	2,6 $\pm$ 0,42
	500mg/kg	2,8 $\pm$ 0,13	3,86 $\pm$ 0,46	4,6 $\pm$ 0,06	4,5 $\pm$ 0,12	2,3 $\pm$ 0,20	2,63 $\pm$ 0,58	1,43 $\pm$ 0,06	1,6 $\pm$ 0,08
LDH	Kontrol	1,2 $\pm$ 0,24	1,23 $\pm$ 0,037	1,6 $\pm$ 0,15	1,8 $\pm$ 0,071	2,8 $\pm$ 0,45	2,4 $\pm$ 0,047	9,7 $\pm$ 0,72	11,7 $\pm$ 0,33
	125mg/kg	1,03 $\pm$ 0,074	1,06 $\pm$ 0,088	1,86 $\pm$ 0,10	1,8 $\pm$ 1,16	1,6 $\pm$ 0,046 **	1,9 $\pm$ 0,40	11,9 $\pm$ 1,01	9,26 $\pm$ 1,56
	250mg/kg	1,1 $\pm$ 0,064	1,16 $\pm$ 0,18	2,9 $\pm$ 0,078 ***	1,96 $\pm$ 0,28	1,86 $\pm$ 0,031 *	2,3 $\pm$ 0,21	7,13 $\pm$ 0,36	7,43 $\pm$ 0,65 **
	500mg/kg	1,2 $\pm$ 0,026	1,36 $\pm$ 0,22	2,83 $\pm$ 0,10 ***	2,06 $\pm$ 0,089	2,76 $\pm$ 0,083	3,2 $\pm$ 0,24	6,4 $\pm$ 0,15 *	5,1 $\pm$ 0,65 ***

Ort: Ortalama

SH: Standart Hata

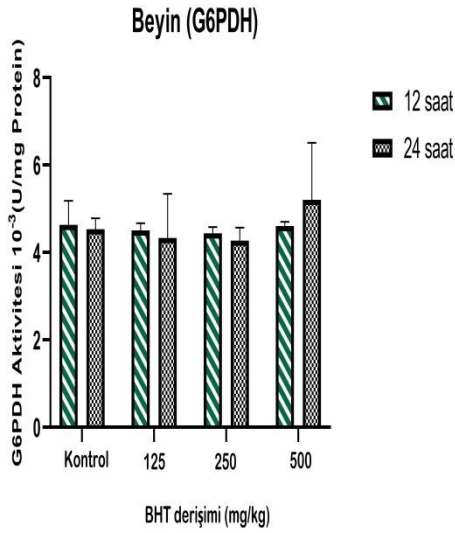
G6PDH: Tablodaki veriler (U/mg protein  $\times 10^{-3}$ )LDH: Tablodaki veriler (U/mg protein  $\times 10^{-1}$ )

\*p&lt;0,05 , \*\*p&lt;0,01 ve \*\*\*p&lt;0,001 BHT uygulanan gruplar kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır.

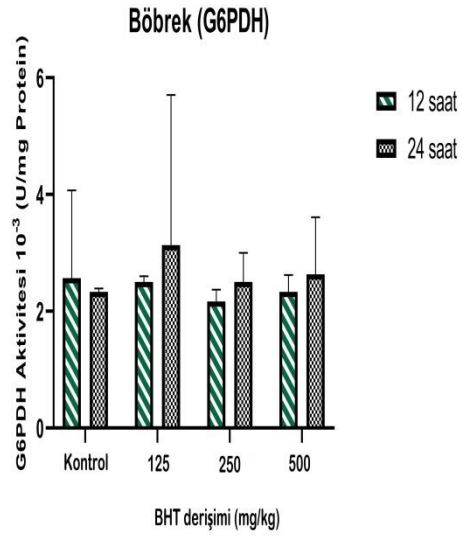


**A**

**B**



**C**



**D**

**Şekil 4.2.** Karaciğer (A), Akciğer (B), Beyin (C) ve Böbrekteki (D) G6PDH seviyesi 12 saatte ve 24 saatte değişiklikleri.

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  ve \*\*\* $p < 0,001$  BHT uygulanan gruplar kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır.

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

BHT, gıda ürünlerinde oksidasyonu veya acılaşmayı önlemek için en yaygın kullanılan antioksidanlardan biridir. Üretiminin başlangıcından bu yana, herhangi bir zararı olmadığından emin olmak için bu konuda birçok araştırma yapılmıştır. BHT'nin vücut üzerindeki etkisinin kapsamı farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada BHT'nin böbrek, akciğer, karaciğer ve beyindeki LDH ile G6PDH aktivitelerinin değişimini inceledik. Verilerimiz, özellikle LDH aktivitesinde, artış ve düşüş olduğunu göstermektedir. BHT 250mg/kg ve 500mg/kg karaciğerde önemli düşüşler gözlenmiştir. Karaciğer, vücuda zararlı maddelerin detoksifikasyonunda yer alan ana organdır. Karaciğer metabolizma bölgesi olduğundan, 250mg/kg ve 500mg/kg BHT enjeksiyonundan sonra LDH aktivitesi azalmıştır. Genellikle antioksidanın rolü vücudu serbest radikallere karşı korumaktır. BHT enjeksiyonundan sonra LDH'daki düşüş ROS inhibisyonundan kaynaklanmış olabilir. Metabolizma sonucunda ROS miktarının azalmış olması, LDH'nin aktivitesinin inhibisyonuna neden olabilir. BHA ve BHT'nin ROS temizleme yetenekleri, ROS seviyelerini azaltmak için sıklıkla kullanıldığı göstermiştir (Cell Death and Differentiation, 2006). ROS'taki azalma, LDH aktivitesinin aşağı regülasyonunu indükler, LDH aktivitesi, hücrel ROS'taki azalma ile inhibe edilmiştir (Shi, Xie, Zhai, Stern, Liu ve Liu, 2009).

LDH, katalitik olarak önemli His-193, Asp-168, Arg-171, Thr-246 ve Arg-106 amino asitlerini içerir. Özellikle His-193, aktif bölgede görev yapan önemli bir amino asittir (Holmes ve Goldberg, 2009). Bu amino asit BHT'nin yapısındaki aktif OH grubu ile tepkime vererek enzimin inhibisyonuna neden olmuş olabilir. His, hem protonlanmış hem de nötr formda bulunabilen imidazol halkasına sahip bir amino asittir. Kolayca iyonize olabilmektedir. Özellikle fizyolojik pH'da hem asit hem de baz gibi davranabilir. pH=7,4'de apolar olarak davrandığı bilinmektedir (Liao, Du, Meng, Pang ve Huang (2013). Yapılan bir çalışmada Proteinlerdeki histidin kalıntılarının, lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinon-2-enal (HNE) ile tepkime için ana hedef olduğu ileri sürülmüştür (Uchida ve Stadtman 1992).

BHT 125mg/kg ve 250mg/kg böbrekte önemli düşüşler gözlenmiştir. LDH enziminde değişen BHT el karşı, artan ya da azalan LDH aktivitesi protein kinaz C enziminin olduğunu söyleyebiliriz. Protein kinaz C'nin aktivasyonu, LDH aktivitesinde önemli artışlara yol açarken, protein kinaz C'nin inhibisyonu LDH aktivitesini azaltır (Hong, Gibney, Esquilin, Yu ve Xia, 2004). Hong ve diğerleri, protein kinaz C'nin LDH aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Öte yandan Malkinson, Beer, Sadler ve Coffman (1985), BHT'nin elmalar üzerindeki toksisitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, BHT'nin protein kinaz C'de bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

BHT'nin 500mg/kg'deki böbrekte derişimine göre LDH'nin enzimatik aktivitesinin önemli bir artış gösterdiği görülmüştür. Ayrıca BHT'nin 250mg/kg ve 500mg/kg 12 saatte beyinde LDH aktivitesinin artırmıştır. Artan LDH seviyeleri doku hasarının bir işaretidir. Bu artışların nedenlerinden biri, yüksek laktat üretimi ile sonuçlanan hipoksemi olabilir. BHT'nin mitokondri üzerindeki zararlı etkilerini gösterebiliriz. Bu durum, hücreyle anaerobik solunum kullanmaya zorlar ve sonuç olarak LDH aktivitesi artar. Fusi, Valoti, Sgaragli ve Murphy (1991) tarafından yapılan bir araştırmayla BHT ve BHA gibi, antioksidanların mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ile iki şekilde etkileşime girdiği bulunmuştur. Bunlardan ilki iç mitokondriyal zarı protonlara daha geçirgen hale getirerek fosforilasyonu oksidasyondan ayırması, ikincisi ise elektron taşıma zinciri ile doğrudan etkileşim yoluyla solunumu engelleyerek etkileşime girmesidir. Dolayısıyla oksijenli solunumun bloke olduğunu ileri sürmüşlerdir. Artan LDH aktivitesi anaerobiyozun göstergesidir. Nakagawa, Yaguchi ve Suzuki, (1994) tarafından yapılan bir çalışma, mitokondrinin BHT toksisitesi için ana hedef organel olduğunu göstermiştir. Kabeya, Kanashiro, Azzolini, Santos, ve Lucisano-Valim, (2008) tarafından yapılan başka bir çalışma da, BHT'nin nötrofillerden LDH salınımında derişime bağlı bir artışı desteklediğini ve hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. LDH aktivitesinin bozulması, BHT ve BHA'nın nispeten yüksek derişimlerde miyokardiyal hücrelere zarar verdiğini bulan Leslie ve diğerlerinin (1978) çalışmasında gösterildiği gibi, bir yaralanma belirtisidir. 100 ppm (sırasıyla 0,45 ve 0,55 mM) derişimlerde BHT ve BHA derişimleri 1000 ppm'ye

(4,5 mM) yükseltildiğinde, LDH kültürlü miyokardiyal ve endoteloid hücrelerde belirgin sızıntı üretmiş ve sırasıyla (5,5 mM), 1 saatlik bir maruziyet döneminden sonra belirgin hücre lizizi gözlenmiştir. 250mg/kg ve 500mg/kg'deki BHT, 12 saatte LDH'de bir artışa neden olurken, beyinde LDH aktivitesi 24 saat sonra azalmıştır. 24 saat sonra, beyin bariyerinin BHT geçirgenliğinin kısmi bir sınırlaması bu sonuçları açıklayabilir.

Araştırmamızın sonuçları, G6PDH'nin anlamlı bir fark yaşamadığını göstermiştir. Sadece karaciğer ve akciğerde G6PDH'de istatistiksel olarak anlamsız bir azalma olmuştur. Bu enzimdeki azalmanın nedenlerinden birisi de glikozdaki azalma olabilir. Polat, Dere, Gül, Yelkuvan, Özdemir ve Bingöl (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, haftada 200 mg/kg BHT dozu alan albino Wistar sıçanlarda karaciğerde glikojen düzeylerinde önemli artışlar saptanmıştır. Glikojen, karaciğerde ve kaslarda glikozun depolanma şeklini temsil eder. Artması glikozda bir azalmaya ve ardından G6PDH'de de bir azalmaya neden olur. Omaye ve diğerleri (1977) çalışmalarında, farelerde 62,5, 215 veya 500 mg/kg BHT'nin tek bir ip enjeksiyonundan sonra, akciğer ağırlığında G6PDH gibi enzimatik aktivitelere doza bağlı bir artış olduğunu bulmuşlardır. G6PDH'ın azalması DNA sentezinin azalmasına neden olabilir. Daugherty, Davis ve Yielding (1978) yapılan bir çalışmada, yarı-konservatif DNA sentezinin hem BHT hem de metabolitler tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir.

Sonuç olarak beyinde LDH aktiviteleri BHT (250mg/kg ve 500mg/kg) uygulamasından sonra 12 saatte kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış göstermiştir. Karaciğerde (250mg/kg ve 500mg/kg) ve böbrekte (125mg/kg ve 250mg/kg) LDH aktivitelerinde anlamlı bir azalma gözlenmiş, ancak BHT'nin 500mg/kg böbrekte önemli bir artış göstermiştir. G6PDH aktivitesi kontrol değerlerine göre düşüş ve artışlar göstermesine rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamsız görülmüştür.



## KAYNAKLAR

Acharya, S., Kale, J., Hallikeri, K. ve Desai, A. (2018). Prognostic Significance of Preoperative Salivary and Serum Lactate Dehydrogenase in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Acta Scientific Cancer Biology*, 2 (8), 2-10.

Alkhatib, A. J. ve Alrakaf, N. A. M. (2019). Lactate Dehydrogenase: Physiological Roles and Clinical Implications. *Am J Biomed Sci & Res*, 3(5). doi:10.34297/AJBSR.2019.03.000705

Anonim. (2002). Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*, 2, 19-94.

Au, S.W., Gover, S., Lam, V.M. ve Adams, M.J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8, 293–303.

Bauer, A.K., Dwyer-Nield, L.D., Hankin, J.A., Murphy, R.C. ve Malkinson, A.M. (2001). The lung tumor promoter butylated hydroxytoluene (BHT) causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology*, 169, 1–15. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00475-9.

Baumgart, E., Fahimi, H.D., Stich, A. Ve Völkl, A. (1996). L-lactate dehydrogenase A4- and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver. Evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. *J Biol Chem*, 16, 271 (7), 3846-3855. doi: 10.1074/jbc.271.7.3846.

Becker, H.D. (1969). Quinone dehydrogenation. IV. One-electron oxidations with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone. *J Org Chem*, 34 (5), 1203-1210.

Belfield, K.D. ve Tichy, E.M. (2018). Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Health Syst Pharm*, 1;75 (3), 97-104. doi: 10.2146/ajhp160961.

Boehringer Mannheim GmbH. (1987). Biochemica Information: A Revised Biochemical Reference Source, s. 246.

Boskou, D. (1999). Non-nutrient antioxidants and stability of frying oils. *Technomic Publishing CO, INC. Lancaster, Pennsylvania*, 183-204.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.

Branen AL. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*, 52 (2), 59-63.

- Castro, L.D.S., Bracht, L., Comar, J.F., Peralta, R.M. ve Bracht, A. (2017). A reappraisal of the proposed metabolic and antioxidant actions of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver. *J Biochem Mol Toxicol*, 31(8). doi: 10.1002/jbt.21924.
- Cell Death and Differentiation. (2006). Butylated hydroxyanisole is more than a reactive oxygen species scavenger. *Nature Publishing Group*, 13, 166–169. doi:10.1038/sj.cdd.4401746.
- Conacher, H.B., Iverson, F., Lau, P.Y. ve Page, B.D. (1986). Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation. *Food Chem Toxicol*, 24 (10–11), 1159– 1162. doi: 10.1016/0278-6915(86)90302-9.
- Conning, D.M. ve Phillips, J.C. (1986). Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food Chem Toxicol*, 24 (10–11), 1145-1148. doi: 10.1016/0278-6915(86)90300-5.
- Daniel, J.W. (1986). Metabolic aspects of antioxidants and preservatives. *Xenobiotica*, 16 (10-11), 1073-1078. doi: 10.3109/00498258609038984.
- Daniel, J.W., Gage, J.C., Jones, D.I. ve Stevens, M.A. (1967). Excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) by man. *Food Cosmet Toxicol*, 5, 475-479. doi: 10.1016/S0015-6264(67)83148-1.
- Daniel, J.W., Gage, J.C. ve Jones, D.I. (1968). The metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene in the rat and in man. *Biochem J*, 106(4), 783– 790.
- Daugherty, J.P., Davis, S. ve Yielding, K.L. (1978). Inhibition by butylated hydroxytoluene of excision repair synthesis and semiconservative DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 28:80 (4), 963-969. doi: 10.1016/0006-291x(78)91339-6.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Scientific Opinion on the reevaluation of Butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, 10 (3), 2588, 43. [www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm)
- Flyvholm, M.A. ve Menné, T. (1990). Sensitizing risk of butylated hydroxytoluene based on exposure and effect data. *Contact Dermatitis*, 23(5):341-5. doi: 10.1111/j.1600-0536.1990.tb05169.x.
- Fusi, F., Valoti, M., Sgaragli, G. ve Murphy, M.P. (1991). The interaction of antioxidants and structurally related compounds with mitochondrial oxidative phosphorylation. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 13 (9), 599-603.
- Guyton, K. Z., Bhan, P., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Trush, M. A. ve Kensler, T.W. (1991). Free radical-derived quinone methide mediates skin tumor

promotion by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: expanded role for electrophiles in multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 946–950. doi: 10.1073/pnas.88.3.946.

Ham, J., Lim, W., Whang, K.Y. ve Song, G. (2020). Butylated hydroxytoluene induces dysregulation of calcium homeostasis and endoplasmic reticulum stress resulting in mouse Leydig cell death. *Environ Pollut*, 256:113421.

Hilton, J.W. (1989). Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods. *Can Vet J*, 30 (8), 682-684.

Ho, H.Y., Cheng, M.L. ve Chiu, D.T. (2005). G6PD--an old bottle with new wine. *Chang Gung Med J*, 28, 606–612.

Holder, G.M., Ryan, A.J., Watson, T.R. ve Wiebe, L.I. (1970). The metabolism of butylatedhydroxytoluene (3,5-di-t-butyl-hydroxytoluene) in man. *J. Pharm. Pharmacol*, 22, 375-376.

Holmes, R.S. ve Goldberg, E. (2009). Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: human, mouse, opossum and platypus LDHs. *Comput. Biol. Chem*, 33 (5), 379-385.

Hong, S. S., Gibney, G.T., Esquilin, M., Yu, J. Ve Xia, Y. (2004). Effect of protein kinases on lactate dehydrogenase activity in cortical neurons during hypoxia. *Brain Res*, 29, 1009 (1-2):195-202. doi: 10.1016/j.brainres.2004.03.004. PMID:15120597.

Irache, J. M., Vega , F. A. Ve Ezpeleta. I. (1992). Antioxidants in some pharmaceuticals, cosmetics, and food from the European market. *Pharm. Acta Helv*, 67, 152-155.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1996). 833. *Butylated hydroxytoluene. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. Prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 35*, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je02.htm>

Joshi, P.S., Chougule,M., Dudanakar, M. ve Golgire,S. (2012). Comparison between salivary and serum lactate dehydrogenase levels in patients with oral leukoplakia, and oral squamous cell carcinoma - A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 3 (4), 7-12.

Kabeya, L. M., Kanashiro, A., Azzolini, A. E. C. S., Santos, A. C. ve Lucisano-Valim, Y. M. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity as mediators of the neutrophil chemiluminescence inhibition by butylated hydroxytoluene. *Pharmazie* 63, 67–70 (2008). doi:10.1691/ph.2008.7570

Kerbiriou, A. (2018). Intérêt d'un outil de médecine de précision pour l'aide à la décision en santé mammaire et l'évaluation de l'état inflammatoire chez la vache laitière. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT*, s. 68.

Khan, A.A., Allemailem, K.S., Alhumaydhi, F.A., Gowder, S.J.T. ve Rahmani, A.H. (2020). The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 20 (6), 855-868.

Kletzien, R.F., Harris, P.K. ve Foellmi, L.A. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb*, 8, 174-181.

Koukourakis, M.I. ve Giatromanolaki, A. (2019). Warburg effect, lactate dehydrogenase, and radio/chemo-therapy efficacy. *Int J Radiat Biol*, 95 (4), 408-426. doi: 10.1080/09553002.2018.1490041.

Lambert ,C.R., Black, H.S. ve Truscott, T.G. (1996). Reactivity of butylated hydroxytoluene. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 (3), 395-400.

Lanigan, R. S. ve Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT(1). *International Journal of Toxicology*, 21, 19–94.

Le Gal, K., Ibrahim, M.X., Wiel, C., Sayin, V.I., Akula, M.K., Karlsson, C., ... Bergo, M.O. (2015). Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci. Transl. Med*, 7, 308re8. doi: 10.1126/scitranslmed.aad3740.

Lemercier, J. N., Meier, B., Gomez, J. D. ve Thompson, J.A. (2004). Inhibition of glutathione Stransferase P1-1 in mouse lung epithelial cells by the tumor promoter 2,6-di-tertbutyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone (BHT-quinone methide): protein adducts investigated by electrospray mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol*, 17, 1675-1683. doi: 10.1021/tx049811x. PMID: 15606144.

Leslie, S.W., Gad, S.C. ve Acosta, D. (1978). Cytotoxicity of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole in cultured heart cells. *Toxicology*, 10(3):281-9.

Liao SM, Du QS, Meng JZ, Pang ZW, Huang RB. (2013) The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chem Cent J*. 7 (1), 44.

Madhavi ,D., Deshpande, S. ve Salunkhe, D. (1996). Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. *Marcel Dekker, New York*.

Malkinson, A.M., Beer, D.S., Sadler, A.J. ve Coffman, D.S. (1985). Decrease in the protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an endogenous lung protein (Mr 36,000) following treatment of mice with the tumor-modulatory agent butylated hydroxytoluene. *Cancer Res*, 45 (11 Pt 2), 5751-5756. PMID: 4053047

Markert, C.L. (1984). Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem Funct*, 2 (3), 131-134. doi: 10.1002/cbf.290020302.

Marilou, N. (2016). LE BHT. *Universite de Quebeq a chicoutimi. dess de cosmetologie*.30.

Matsuo, M., Mihara, K., Okuno, M., Ohkawa, H. ve Miyamoto, J. (1984). Comparative metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) in mice and rats. *Food Chem Toxicol*, 22 (5), 345-354. doi: 10.1016/0278-6915(84)90362-4.

Mean, S., Değer, Y. ve Yıldırım, S. (2018). Effects of butylated hydroxytoluene on blood liver enzymes and liver glutathione and glutathione-dependent enzymes in rats. *Bulg. J. Vet. Med*, 21, No 4, 461–469

Nagai, F., Ushiyama, K. ve Kano, I. (1993). DNA cleavage by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Arch. Toxicol*, 67 (8), 552–7. doi: 10.1007/BF01969268.

Nakagawa, Y., Yaguchi, K. ve Suzuki, T. (1994). Comparative cytotoxicity between butylated hydroxytoluene and its methylcarbamate derivative terbucarb, on isolated rat hepatocytes. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol*. 52, 51 1-51 5.

National Center for Biotechnology Information. (2022). PubChem Compound Summary for CID 31404, Butylated hydroxytoluene. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butylated-hydroxytoluene>.

Nieva-Echevarría, B., Manzanos, M.J., Goicoechea, E. ve Guillén, M.D. (2015). 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 14 (1), 67-80.

Ohtsu, Y., Susaki, Y. ve Noguchi, K. (2018). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of the novel helicase-primase inhibitor, amenamevir (ASP2151), in rodents. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet*, 43, 693-706. doi: 10.1007/s13318-018-0481-y.

Oikawa, S., Nishino, K., Oikawa, S., Inoue, S., Mizutani, T. ve Kawanishi, S. (1998). Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochem Pharmacol*, 56 (3), 361-370. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00037-9.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2002). *2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT)*. Paris, France, 185.

Polat, F., Dere, E., Gül, E., Yelkuvan, I., Özdemir, Ö. ve Bingöl, G. (2013). The effect of 3-methylcholanthrene and butylated hydroxytoluene on glycogen levels

- of liver, muscle, testis, and tumor tissues of rats. *Turkish Journal of Biology, TÜBİTAK*, 37: 33-38. doi:10.3906/biy-1010-126.
- Powell, C.J., Connelly, J.C., Jones, S.M., Grasso, P. ve Bridges, J.W. (1999). Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity, *Food Chem. Toxicol*, 24, 1131e1143.
- Reische, D.W., Lillard, D.A. ve Eitenmiller, R.R. (1998). Antioxidants, *Food Sci. Technol.* (N. Y.) 423-448
- Read, J.A., Winter, V.J., Eszes, C.M., Sessions, R.B. ve Brady, R.L. (2001). Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins*, 43, 175-185.
- Rodil, R., Quintana, J.B. ve Cela, R. (2012). Oxidation of synthetic phenolic antioxidants during water chlorination. *J Hazard Mater*, 199-200, 73–81. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.058
- Safer, A.M. ve al-Nughamish, A.J. (1999). Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study. *Histol Histopathol*, 14 (2), 391-406. doi: 10.14670/HH-14.391.
- Shi, D.Y., Xie, F.Z., Zhai, C., Stern, J.S., Liu, Y. ve Liu, S.L. (2009). The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. *Mol Cancer*, 8:32. doi: 10.1186/1476-4598-8-32.
- Stanton, R.C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64 (5), 362-369. doi: 10.1002/iub.1017.
- Thompson, J. A. ve Bolton, J. L. (1991). Relationship between the metabolism of butylated hydroxytoluene and lung tumor promotion in mice. *Experimental Lung Research*, 17, 439-453.
- Thompson, J.A., Carlson, T.J., Sun, Y., Dwyer-Nield, L.D. ve Malkinson, A.M. (2001). Studies using structural analogs and inbred strain differences to support a role for quinone methide metabolites of butylated hydroxytoluene (BHT) in mouse lung tumor promotion. *Toxicology*, 160 (1–3), 197-205. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00449-2
- Uchida K., Stadtman E.R. (1992). Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal *Proc Natl Acad Sci*, 15;89 (10), 4544-4548 doi: 10.1073/pnas.89.10.4544.
- Valvona, C.J., Fillmore, H.L., Nunn, P.B. ve Pilkington, G.J. (2016). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol*, 26 (1), 3-17.

- Wang, W., Kannan, P., Xue, J. ve Kannan, K. (2016). Synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene (BHT), in resin-based dental sealants. *Environ. Res*, 151, 339-343
- Wang, W. ve Kannan, K. (2019). Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environ. Int*, 128, 24-29
- Waseem, M. ve Kaw, J.L. (1994). Pulmonary effects of butylated hydroxytoluene in mice. *Food Addit Contam*, 11 (1), 33-8. doi: 10.1080/02652039409374200.
- Warner, C.R., Brumley, W.C., Daniels, D. H., Joe, J.r.F.L. ve Fazio, T. (1986). Reactions of antioxidants in foods. *Food Chem Toxicol*, 24 (10–11), 1015-1019. doi: 10.1016/0278-6915(86)90282-6
- Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. ve Whysner, J. (1999). Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37 (9), 1027-1038.
- Witschi, H., Malkinson, A.M. ve Thompson, J.A. (1989). Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). *Pharmacol Ther*. 42 (1), 89-113.
- Yamamoto, K., Tajima, K., Takemura, M. ve Mizutani, T. (1991). Further metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid, a major metabolite of butylated hydroxytoluene, in rats. *Chem Pharm Bull*, 39 (2), 512– 514.
- Yehye, W.A., Rahman, N.A., Ariffin, A., Abd Hamid, S.B., Alhadi, A.A., Kadir, F.A. ve Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT):A review. *Eur J Med Chem*. 28;101, 295-312.
- Zhang, R., Li, J. ve Cui, X. (2020). Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,6-di-tert-butyl-hydroxytoluene in mice. *Sci Total Environ*, 15, 739, 139862.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aboush EL ARFAOUI  
Doğum Yeri ve Tarihi : 31/03/1994 FAS  
Yabancı Dil : Arapça, Fransızca, İngilizce

Eğitim Durumu  
Lise : Ibn Khaldoun, Fas  
Lisans : Cadi Ayyad Üniversitesi, Faculte Polydisciplinaire  
de Safi, Fas  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :

İletişim (e-posta) : 1994.abouch.elarfaoui@gmail.com

Yayınları : Lactate Dehydrogenase Enzyme Activity in Some  
Tissues of Rats Exposed to Methyl Parathion